

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



**FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO MASIVO DE LOS POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO
ÚNICO RELACIONADOS CON EL PRONÓSTICO Y LA
TOXICIDAD EN PACIENTES CON CÁNCER DE COLON EN
ESTADIOS II-III TRATADOS DE FORMA ADYUVANTE CON
ESQUEMAS DE QUIMIOTERAPIA BASADOS EN
OXALIPLATINO Y FLUOROPIRIMIDINAS**

**Memoria presentada para la obtención del grado de
Doctor en Medicina por
Ana Belén Custodio Carretero**

Dirigida por el Dr. Jaime Feliu Batlle

Madrid 2015

D. Jaime Feliu, Jefe de Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario La Paz y Profesor Titular de la Universidad Autónoma de Madrid

Certifica:

Que Ana Belén Custodio Carretero ha realizado, bajo mi dirección, el trabajo titulado “Estudio masivo de los polimorfismos de nucleótido único relacionados con el pronóstico y la toxicidad en pacientes con cáncer de colon en estadios II-III tratados de forma adyuvante con esquemas de quimioterapia basados en oxaliplatino y fluoropirimidinas”

para optar al grado de Doctor en Medicina

Dicho trabajo reúne, a mi juicio, las condiciones de originalidad, interés científico y rigor metodológico necesarios y, por tanto, avalo su presentación para ser juzgado.

Para que conste, firmo el presente certificado en:

Madrid, a 25 de febrero de 2015

Dr. Jaime Feliu Batlle

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	5
I. RESUMEN.....	7
II. INTRODUCCIÓN.....	11
1. Aspectos generales.....	13
2. Cáncer de colon: Aspectos clínicos.....	14
2.1. Epidemiología.....	14
2.2. Diagnóstico y estudio de extensión.....	15
2.3. Estadificación.....	17
2.4. Tratamiento quirúrgico del cáncer de colon localizado.....	19
2.5. Quimioterapia adyuvante en cáncer de colon localizado.....	21
3. Determinantes pronósticos clínico-patológicos en los estadios iniciales de cáncer colorrectal.....	33
3.1. Factores pronóstico clínicos.....	33
3.2. Factores pronóstico patológicos.....	35
4. Marcadores moleculares con valor pronóstico y predictivo de respuesta y toxicidad en estadios iniciales de cáncer colorrectal.....	42
4.1. Inestabilidad de microsátélites (IMS).....	42
4.2. Vía de señalización RAS/RAF/MAPK.....	47
4.3. Perfiles de expresión génica y de microRNAs.....	50
5. Farmacogenómica. Estudio de polimorfismos como factores pronóstico y predictivos de respuesta y toxicidad a agentes quimioterápicos.....	53
5.1. Introducción.....	53
5.2. Polimorfismos en los genes implicados en la farmacología del 5-FU y otras fluoropirimidinas.....	56
5.3. Polimorfismos en los genes implicados en la farmacología del oxaliplatino.....	70

5.4. Polimorfismos en la vía de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).....	80
5.5. Polimorfismos en genes relacionados con la angiogénesis.....	83
5.6. Polimorfismos en genes implicados en el metabolismo y transporte de fármacos.....	85
5.7. Polimorfismos en genes implicados en la adhesión e invasividad celular.....	90
5.8. Polimorfismos en la familia del factor de crecimiento insulínico (IGF).....	92
5.9. Polimorfismos en genes implicados en el ciclo celular.....	93
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	95
1. Hipótesis de trabajo.....	97
2. Objetivos del trabajo.....	98
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	99
1. Diseño del estudio.....	101
2. Selección de pacientes. Esquemas de tratamiento.....	101
2.1. Selección de pacientes. Criterios de inclusión y de exclusión.....	101
2.2. Consideraciones éticas.....	104
2.3. Esquemas de tratamiento adyuvante.....	104
2.4. Protocolo de seguimiento.....	106
3. Selección de polimorfismos candidatos.....	106
4. Metodología experimental.....	112
4.1. Obtención de datos clínicos y anatomopatológicos.....	112
4.2. Evaluación y manejo de la toxicidad.....	113
4.3. Procesamiento de las muestras. Proceso de genotipado.....	114
5. Análisis estadístico.....	123

V. RESULTADOS.....	125
1. Evaluación descriptiva.....	127
1.1. Características demográficas, clínicas y patológicas de las cohortes de diseño y de validación.....	127
1.2. Tratamiento adyuvante.....	129
1.3. Polimorfismos de nucleótido único (SNPs).....	131
2. Análisis de supervivencia.....	138
2.1. Supervivencia libre de enfermedad (SLE).....	138
2.2. Supervivencia global (SG).....	138
2.3. Análisis de la SLE y la SG en función de las características clínico-patológicas y el tratamiento.....	140
2.4. Análisis de la supervivencia libre de enfermedad en función de los SNPs.....	144
2.5. Análisis de la supervivencia global en función de los SNPs.....	152
2.6. Valor pronóstico de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en función del estadio y del sexo.....	159
3. Análisis de toxicidad.....	171
3.1. Evaluación de la toxicidad global y de las toxicidades específicas.....	171
3.2. Análisis de toxicidad global en función de los SNPs.....	174
VI. DISCUSIÓN.....	181
1. Planteamiento del estudio.....	183
2. Discusión de la metodología.....	184
2.1. Diseño óptimo de los estudios farmacogenómicos.....	184
2.2. Elección de la cohorte de estudio y obtención de la muestra.....	185
2.3. Definición del fenotipo de interés.....	186
2.4. Selección de polimorfismos. Metodología de los estudios farmacogenómicos.....	187
2.5. Proceso de genotipado mediante la tecnología iPLEX® Gold MassARRAY (SEQUENOM).....	190
2.6. Análisis estadístico y validación de los resultados.....	191

3. Discusión de los resultados.....	191
3.1. Datos clínico-patológicos, supervivencia y toxicidad.....	191
3.2. Contextualización del estudio.....	195
3.3. Interpretación de los polimorfismos con valor pronóstico y predictivo del desarrollo de toxicidad.....	199
3.3.1. E-selectina (SELE) rs3917412.....	199
3.3.2. MTHFR rs1801133.....	202
3.3.3. XRCC2 rs3218408.....	204
3.4. Valor pronóstico de los SNP SELE rs3917412 y MTHFR rs1801133 en función del estadio y del sexo.....	205
4. Aplicabilidad clínica de los resultados y perspectivas futuras.....	208
4.1. Estratificación del riesgo y tratamiento personalizado.....	208
4.2. SELE y MTHFR como potenciales dianas terapéuticas.....	209
4.3. Perspectivas futuras.....	211
 VII. CONCLUSIONES.....	 213
 VIII. APÉNDICE.....	 217
1. Artículos publicados en revistas internacionales relacionados con la línea de investigación.....	219
2. Clave de abreviaturas.....	239
3. Índice de tablas.....	243
4. Índice de figuras.....	246
 IX. BIBLIOGRAFÍA.....	 249

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría en las siguientes líneas expresar mi agradecimiento sincero a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, a mi director de tesis, el Dr. Jaime Feliu, como mentor y modelo profesional, por su confianza, su dedicación durante todo el desarrollo del trabajo, por los consejos y el estímulo constante para crecer como médico e investigador, por la oportunidad de formar parte de éste y otros tantos proyectos.

Al Dr. Javier de Castro, por su gran ayuda durante estos primeros años en el mundo de la Oncología, por la oportunidad de aprender a su lado, por su implicación, por los consejos sinceros.

A mis predecesores en la consulta 5. Al Dr. Jorge Barriuso, por el espíritu crítico, por el consuelo de la ciencia, por todo lo aprendido. A la Dra. Nadia Hindi, por hacer sencillo lo complicado, por su valentía y su elegancia, por el tiempo compartido.

A los residentes de Oncología, por la inquietud y el entusiasmo que conseguís transmitir. Al resto de compañeros del Servicio de Oncología Médica del Hospital La Paz con los que tengo la oportunidad de trabajar cada día.

A todos los componentes del Laboratorio de Oncología Translacional de nuestro Servicio, en especial al Dr. Juan Moreno y la Dra. Paloma Cejas, por ser pilares fundamentales de este trabajo, por la capacidad de esfuerzo, las enseñanzas y las críticas constructivas. A los compañeros de los Servicios de Cirugía General y Anatomía Patológica del Hospital La Paz, por su implicación y colaboración.

A la Dra. Rosario Madero, por su ayuda inestimable en las explicaciones del método estadístico, por su disponibilidad, por el tiempo invertido en el trabajo.

A los compañeros de los Servicios de Oncología Médica y de Anatomía Patológica del Hospital Universitario La Fe (Valencia), Hospital General de Elche (Alicante), Instituto Valenciano de Oncología (IVO), Hospital Universitario Clínic de Barcelona y Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, porque su colaboración y dedicación han sido indispensables para el desarrollo de este proyecto.

A la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), por sus iniciativas para impulsar la investigación oncológica, por hacer posible con su financiación la realización de este estudio.

A los enfermos por quienes todo tiene sentido.

A los compañeros del Servicio de Oncología Médica del Hospital Clínico San Carlos, al Profesor Díaz-Rubio, Dr. Javier Sastre, Dra. Sara López, Dr. Antonio Calles, Dra. Jana Bobokova, a mis residentes mayores y pequeños, por la valiosa oportunidad de formarme como oncóloga, de crecer personal y profesionalmente con vosotros. Al Servicio de Oncología Médica del Hospital Puerta de Hierro, al Dr. Mariano Provencio, a la Dra. Míriam Méndez, por la posibilidad de conocerlos y trabajar a vuestro lado, por todo lo que aprendí y disfruté, por contar conmigo, por vuestra ayuda.

A mis amigos, a los de siempre y a los de los últimos años, por ayudarme a pensar más allá de la Medicina.

A mi familia, mis abuelos, mis tíos y mis primos, por todos los buenos momentos, por preocuparos tanto por mí, por acompañarme.

A la familia de Jose, a Manuel, por ayudarme y animarme siempre, por confiar en mí, por los ratos divertidos.

A mis padres, por vuestro cariño y dedicación incondicional, por estar siempre conmigo, por los consejos tan valiosos, por recordarme cada día las cosas importantes. Sin duda hoy no estaría escribiendo estas líneas sin vuestra ayuda.

A Jose, por compartir los esfuerzos, las ilusiones y los contratiempos, por tantos momentos felices, por estar siempre a mí lado, animándome.

Muchas gracias a todos.

I. RESUMEN

Introducción: En la actualidad se recomienda la administración de quimioterapia (QT) adyuvante basada en oxaliplatino y fluoropirimidinas en pacientes con CC estadio III y en un grupo seleccionado de estadios II con factores de riesgo. El beneficio de dicho tratamiento se ha demostrado ampliamente en los estadios III, en los que se consigue una reducción del riesgo de recidiva de aproximadamente el 30%, mientras que su valor en los estadios II continúa siendo controvertido. Aunque los factores clínico-patológicos convencionales son ampliamente utilizados para estimar el pronóstico, presentan limitaciones importantes y no permiten predecir el beneficio potencial del tratamiento. Además, hasta el 30-40% de los enfermos presentará eventos adversos grado 3-4 y el 0.5-1% complicaciones fatales en relación con la terapia adyuvante. Por lo tanto, resulta esencial mejorar la capacidad pronóstica de dichos factores mediante la identificación de marcadores que permitan individualizar el tratamiento en función del riesgo de recidiva o del desarrollo de toxicidad. En los últimos años se ha estudiado el valor pronóstico y predictivo de múltiples marcadores moleculares, como la inestabilidad de microsatélites o las firmas génicas, obteniendo resultados prometedores pero sin clara aplicabilidad clínica en la actualidad. También se ha evaluado el impacto en el pronóstico o la predicción de toxicidad de varios polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en genes implicados en el metabolismo y transporte de los agentes quimioterápicos, la reparación del DNA, las vías de señalización y respuesta celular, los mecanismos de invasividad, la inflamación o la angiogénesis, pero los resultados obtenidos no han sido concluyentes. A este respecto, cabe destacar que la mayoría de los estudios farmacogenómicos realizados hasta la fecha han utilizado una metodología basada en el análisis de uno o unos pocos SNP. Teniendo en cuenta que la mayoría de los tratamientos oncológicos actúan sobre múltiples dianas, es poco probable que este abordaje pueda explicar la variabilidad individual en la eficacia y toxicidad de los fármacos. Sin embargo, los avances actuales en las técnicas de genotipado permiten abordar este problema desde una perspectiva más amplia, al poder investigar de forma sencilla los SNPs de un amplio número de genes implicados en los procesos descritos, lo cual aumentaría la capacidad de detectar diferencias genéticas entre pacientes con respecto a la respuesta a los fármacos o sus efectos adversos.

El objetivo de nuestro trabajo es estudiar el impacto en el pronóstico o en el desarrollo de toxicidad de varios SNPs en genes implicados en el metabolismo del oxaliplatino y las fluoropirimidinas, los mecanismos de reparación del ADN, el transporte de fármacos, la angiogénesis u otras vías moleculares en pacientes con CC estadio II-III tratados con QT adyuvante basada en oxaliplatino y fluoropirimidinas.

Material y Métodos: Se trata de un estudio retrospectivo y multicéntrico en el que se ha evaluado la posible asociación de 67 SNPs en 32 genes candidatos con el pronóstico y el desarrollo de toxicidad en 202 pacientes con CC estadio II-III tratados con esquemas de QT basados en oxaliplatino y fluoropirimidinas (cohorte de diseño). El proceso de genotipado se ha llevado a cabo en material genético obtenido de muestras parafinadas mediante la tecnología MassARRAY (SEQUENOM). Para validar los resultados obtenidos se ha empleado una cohorte independiente de 177 pacientes tratados con los mismos esquemas de QT durante el mismo período de tiempo (cohorte de validación).

Resultados: Los pacientes portadores de los SNPs E-selectina (SELE) rs3917412 G>A G/G y metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) rs1801133 C>T T/T presentaron un riesgo de recaída significativamente superior que aquellos con los genotipos SELE G/A-A/A y/o MTHFR C/T-C/C tanto en la cohorte de diseño (HR=3.28; p=0.015) como en la de validación (HR=2.45; p=0.038), independientemente de otros factores pronósticos relevantes como el estadio, la invasión linfocascular y la perforación intestinal. La combinación de ambos SNPs también se asoció con una SG significativamente inferior en ambas cohortes. Su valor pronóstico es dependiente del sexo y del estadio tumoral, relacionándose con un pronóstico desfavorable en mujeres y en pacientes con estadio III, pero sin encontrarse diferencias significativas en varones o en estadios II. Además, se objetivó una incidencia de eventos adversos grado 3-4 significativamente superior en los portadores de los SNPs X-ray repair cross-complementing group 2 (XRCC2) rs3218408 T>G T/T y MTHFR 1801133 C>T C/C que en aquellos con la combinación XRCC2 T/G-G/G o MTHFR C/T-T/T o XRCC2 T/G-G/G y MTHFR C/T-T/T en las dos cohortes, independientemente de la edad, el sexo, el esquema de QT adyuvante y la dosis acumulada de oxaliplatino.

Conclusión: Los SNPs SELE rs3917412, MTHFR rs1801133 y XRCC2 rs3218408 son de utilidad como predictores farmacogenómicos del riesgo de recaída y del desarrollo de toxicidad severa en pacientes con CC estadios II-III tratados con QT adyuvante basada en oxaliplatino y fluoropirimidinas. Aunque se requiere la confirmación en estudios prospectivos a gran escala, estos resultados pueden contribuir a mejorar la capacidad pronóstica de los factores clínicos-patológicos clásicos permitiendo individualizar las estrategias de tratamiento adyuvante.

II. INTRODUCCIÓN

1. ASPECTOS GENERALES

El cáncer colorrectal (CCR) es una enfermedad prevalente y con frecuencia letal¹⁻⁶. En los últimos años, el avance en las técnicas quirúrgicas del tumor primario y las metástasis, el mejor conocimiento de su biología molecular, así como la aparición de nuevos agentes antineoplásicos y fármacos dirigidos a dianas moleculares específicas, han hecho posible un gran avance en el manejo de esta neoplasia, consiguiendo impactar en la supervivencia de los enfermos.

Aunque una proporción importante de pacientes con estadios iniciales pueden curarse únicamente con la cirugía, existe un riesgo considerable de recidiva tras la misma en los estadios III y estadios II con factores de riesgo. En la década de los 90 varios ensayos clínicos demostraron una reducción significativa de las recidivas locales y a distancia con el empleo de la quimioterapia (QT) adyuvante basada en 5-fluorouracilo (5-FU)⁷⁻⁹. Estudios posteriores han logrado mejorar estos resultados al combinar oxaliplatino con los esquemas basados en 5-FU, con lo que se ha conseguido alcanzar tasas de supervivencia libre de enfermedad (SLE) a los 5 años del 63-73%¹⁰⁻¹². En base a estos datos, en la actualidad se recomienda el tratamiento adyuvante basado en oxaliplatino y fluoropirimidinas en todos los pacientes con estadio III y en un grupo seleccionado de pacientes con estadio II de alto riesgo^{13,14}.

En este contexto, el principal problema en la práctica clínica es que para alcanzar estos beneficios potenciales es necesario tratar al 100% de los pacientes, aun sabiendo que en un 50% de los casos el tratamiento sería innecesario porque se lograría la curación sólo con la cirugía, y en otro 30-35% sería ineficaz ya que los pacientes recaerán a pesar de su administración. Por lo tanto, es esencial la identificación de marcadores pronóstico y predictivos de beneficio de la QT adyuvante con el objetivo de individualizar dicho tratamiento.

El principal factor pronóstico de recaída tras la cirugía es el estadio patológico, definido por la profundidad de la invasión de la pared colónica^{15,16} y el número de ganglios linfáticos regionales afectados¹⁷⁻²⁰. Otros factores pronóstico relevantes son la infiltración linfovascular²¹ o perineural^{22,23} en la pieza quirúrgica, la presencia de tumor residual, los valores preoperatorios de antígeno carcinoembrionario (CEA) elevados^{24,25}, la obstrucción intestinal o perforación en el momento del diagnóstico¹⁵, la histología pobremente diferenciada^{26,27} o un número insuficiente de ganglios linfáticos examinados^{28,29}. Además, en los últimos años se ha estudiado el valor pronóstico y predictivo de varios marcadores moleculares, obteniendo resultados prometedores, pero sin clara aplicabilidad clínica en el momento actual³⁰⁻³⁵.

Por otra parte, existen amplias variaciones interindividuales tanto en la respuesta como en la toxicidad de los fármacos antineoplásicos. Aunque las causas son múltiples, la variabilidad genética del huésped desempeña un papel importante. En los últimos años se han publicado numerosos artículos sobre farmacogenética que sugieren que los polimorfismos de ciertos genes implicados en el metabolismo y transporte de los agentes quimioterápicos, la reparación del ADN, las vías de señalización intracelular, los mecanismos de invasividad, la inflamación, la angiogénesis u otras vías oncogénicas relevantes podrían ser útiles como factores pronóstico o factores predictivos de respuesta o toxicidad³⁶⁻⁴⁵. La mayoría de estos estudios han utilizado una metodología basada en el análisis de polimorfismos de uno o unos pocos nucleótidos (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs), lo cual implica conocer a priori la función de los genes y SNPs implicados, y ha dado lugar, con frecuencia, a resultados contradictorios⁴⁶⁻⁴⁸. Sin embargo, debido a que los tratamientos oncológicos ejercen sus efectos sobre múltiples dianas, es poco probable que un único polimorfismo pueda explicar la variabilidad individual en la eficacia y toxicidad. Los avances tecnológicos actuales permiten utilizar tecnologías de alto rendimiento para el estudio combinado de múltiples SNPs, lo cual posibilita abordar el problema desde una perspectiva más amplia, al poder investigar los polimorfismos de un amplio número de genes implicados en los procesos descritos^{49,50}.

2. CÁNCER DE COLON: ASPECTOS CLÍNICOS

2.1. EPIDEMIOLOGÍA

El CCR constituye un problema de salud pública de primer orden debido a su elevada incidencia y mortalidad. A nivel mundial, es el tercer tumor más frecuente en varones y el segundo en mujeres, con más de 1.2 millones de nuevos casos anuales, lo que supone el 9.7% de todos los diagnósticos oncológicos y posiciona al CCR en tercer lugar en incidencia tras el cáncer de pulmón (1.61 millones/año) y el de mama (1.38 millones/año). La incidencia es superior en varones (ratio 1.4). Además, representa la cuarta causa de muerte por cáncer con 608.000 fallecimientos estimados cada año (~8% de todas las muertes por cáncer)¹⁻⁴. En nuestro país la incidencia actual es de 15.537 nuevos casos anuales en hombres y 10.847 en mujeres, con una tasa ajustada por edad de 60.8 y 33.8 casos por cada 100.000 habitantes, respectivamente.

En cuanto a la mortalidad, se ha objetivado una reducción progresiva de la misma en la mayoría de los países occidentales desde mitad de la década de los 80, lo cual

puede explicarse por el diagnóstico en estadios más precoces, la extirpación de los pólipos colónicos como consecuencia de la generalización de los programas de cribado endoscópico, el avance en las técnicas quirúrgicas y la aparición de tratamientos oncológicos más eficaces^{5,51-56}. La tasa de mortalidad por CCR en la Unión Europea oscila entre 15-20 casos por 100.000 varones y 9-14 por 100.000 mujeres, y se ha reducido aproximadamente un 6% por quinquenio en hombres y un 8% en mujeres, objetivándose la mayor reducción en la población entre 30 y 49 años (~10% por quinquenio)⁶. La supervivencia a 5 años por CCR en las diferentes áreas geográficas oscila entre 28.5% a 57% en varones y 30.9% a 60% en mujeres. En contraste con estos datos, se sigue objetivando un incremento de la mortalidad en muchos países con recursos más limitados y una infraestructura sanitaria más deficiente, fundamentalmente en América Central, Sudamérica y Europa del Este^{3,5}.

2.2. DIAGNÓSTICO Y ESTUDIO DE EXTENSIÓN

2.2.1 Diagnóstico del tumor primario

La presencia de un test de sangre oculta en heces patológico tiene un valor predictivo positivo para CCR muy superior a cualquier síntoma o combinación de los mismos⁵⁷.

La colonoscopia es el procedimiento más preciso para el diagnóstico del CCR, con una sensibilidad cercana al 95%⁵⁸⁻⁶⁰. Varios estudios y revisiones sistemáticas recientes han demostrado que la colonografía por tomografía computerizada (TC) o colonoscopia virtual es una alternativa menos invasiva con una sensibilidad similar en pacientes sintomáticos^{58,59}. Sin embargo, puesto que la colonoscopia permite localizar y biopsiar lesiones a lo largo de todo el colon, detectar tumores sincrónicos y extirpar pólipos, se considera la técnica diagnóstica de elección. En aproximadamente el 11-12% de los pacientes no es posible completar el procedimiento⁵⁹, lo cual puede explicarse por la incapacidad del endoscopio de alcanzar el tumor o visualizar la mucosa proximal al mismo por razones técnicas (neoplasias estenosantes, colon tortuoso, preparación deficiente, etc) o por intolerancia del paciente a la prueba. En este contexto la colonoscopia virtual puede proporcionar un diagnóstico radiológico y estudios recientes han objetivado una tasa de detección de CCR o lesiones polipoides superior a la del enema baritado^{58,59,61,62}. En cualquier caso, si no es posible una visualización completa del colon antes de la cirugía, se debe realizar una colonoscopia completa en los 3-6 meses posteriores a la misma.

2.2.2. Estudio de extensión

Entre las exploraciones complementarias incluidas habitualmente en el estudio de extensión se encuentran:

- a) Pruebas de laboratorio: hemograma, bioquímica básica y hepática, coagulación y marcadores tumorales (CEA y antígeno carbohidrato 19.9). El valor predictivo del CEA en el diagnóstico del CCR es limitado, debido a su baja sensibilidad y especificidad en pacientes asintomáticos (36% en estadios I-II, 74% en estadios III y 83% en estadios IV) y a la existencia de múltiples causas no oncológicas de elevación del mismo, entre las que se encuentran la gastritis, la enfermedad ulcerosa péptica, la hepatopatía, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la diabetes, los procesos inflamatorios agudos y crónicos o el hábito tabáquico⁶³. Sin embargo, puede tener utilidad pronóstica y en el seguimiento, ya que un valor >5 ng/ml se relacionan con un pronóstico desfavorable en todos los estadios y la ausencia de normalización del mismo tras la cirugía implica persistencia de enfermedad^{64,65}. Por ello, las principales guías clínicas no recomiendan su determinación en el cribado, pero sí en la evaluación prequirúrgica y seguimiento en los cinco años tras la cirugía^{13,66,67}, ya que permitiría una detección precoz de recidivas, una tasa superior de cirugías de rescate y un aumento de la supervivencia en algunos estudios⁶⁸.
- b) TC de tórax-abdomen-pelvis: La evaluación radiológica del tórax tiene más relevancia teórica en el estadiaje del cáncer de recto, en el que las metástasis pulmonares son más frecuentes que en el cáncer de colon (CC). El mayor problema encontrado en la TC de tórax preoperatoria es la presencia de lesiones pulmonares indeterminadas hasta en un 10-30% de los casos^{69,70}. En una revisión sistemática reciente, sólo el 11% de estos nódulos pulmonares llegaron a ser metástasis a lo largo del seguimiento. La presencia de múltiples lesiones, el tamaño ≥ 5 mm, la localización parenquimatosa en mayor medida que la subpleural o la presencia de metástasis ganglionares u otras metástasis a distancia fueron factores predictores de etiología maligna^{60,71}.

La TC abdominopélvica permite evaluar la extensión local del tumor y las posibles complicaciones asociadas, la afectación ganglionar regional y la diseminación a distancia. Su sensibilidad para detectar metástasis a distancia es superior (75-87%) que para estudiar la afectación ganglionar (45-73%) o la profundidad de la invasión transmural del tumor primario (50-55%)⁷²⁻⁷⁴. Sin embargo, no es un método preciso para evaluar la afectación peritoneal,

variando su sensibilidad según la localización y tamaño de los implantes (11% y 37% para lesiones <0.5 cm y entre 0.5 y 5 cm, respectivamente)^{75,76}.

- c) Resonancia magnética (RM): Un meta-análisis reciente concluye que la RMN es la prueba de imagen más sensible para la evaluación de la afectación hepática, fundamentalmente en pacientes sin tratamiento y en lesiones menores de 10 mm^{74,77}. Sin embargo, las nuevas generaciones de TC y la adquisición de imágenes trifásicas han mejorado de forma notable la sensibilidad de esta prueba, por lo que en la práctica clínica, la RMN hepática se reserva para lesiones dudosas o cuando es precisa una mejor definición de las mismas para tomar decisiones acerca de su potencial resecabilidad.
- d) Tomografía por emisión de positrones (PET): No aporta información adicional relevante respecto a la TC en el estadiaje por lo que no se recomienda su realización rutinaria al diagnóstico^{78,79}. Sin embargo, puede ser de utilidad en la detección de recidivas en pacientes con niveles progresivamente elevados de CEA en los que las pruebas de imagen convencionales no son diagnósticas⁸⁰ o en pacientes candidatos a una cirugía de metástasis hepáticas, ya que permite detectar la presencia de enfermedad extrahepática y reducir en aproximadamente un tercio el número de laparotomías no terapéuticas^{77,79,81}. No obstante, el tratamiento QT puede disminuir su sensibilidad debido a la inhibición de la actividad metabólica de las células tumorales⁸².
- e) Evaluación intraoperatoria: Teniendo en cuenta que una de las principales limitaciones de las pruebas de imagen convencionales es su baja sensibilidad en la detección de enfermedad hepática y peritoneal de pequeño volumen^{75,76}, la realización de una laparoscopia o una ecografía intraoperatoria pueden ser de utilidad en la estadificación clínica inicial y la planificación del tratamiento⁸³.

2.3. ESTADIFICACIÓN

Además de la estadificación clínica, a cada tumor se le asigna un estadio patológico tras la exploración quirúrgica abdominal y el examen histológico de la pieza quirúrgica. En la actualidad se considera de elección el sistema de estadiaje TNM de la *American Joint Committee on Cancer (AJCC)/International Union Against Cancer (UICC)*⁸⁴, por ser más preciso en la identificación de subgrupos pronósticos que la antigua clasificación de Dukes, modificada posteriormente por Astller-Coller. Se basa en la profundidad de la invasión de la pared colorrectal (T), la invasión o adherencia a

Introducción

órganos vecinos (T), la presencia o ausencia y el número de ganglios linfáticos regionales afectos (N) y la presencia o ausencia de metástasis a distancia (M)⁸⁵.

La clasificación TNM más reciente data del año 2010⁸⁵. Dicha clasificación ha incorporado varios cambios respecto a la previa del año 2002 teniendo en cuenta la información pronóstica derivada del análisis de 109.953 pacientes con CC incluidos en el registro SEER entre los años 1994 y 2004⁸⁶. Las definiciones T, N y M y la clasificación por estadios según la 7ª edición del sistema de estadiaje TNM (AJCC/UICC 2010) se resumen en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

Tabla 1: Definiciones TNM (AJCC/UICC 2010)

TUMOR PRIMARIO (T)	
Tx	No se puede evaluar el tumor primario
T0	Sin evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ: intraepitelial o invasión de la lámina propia*
T1	El tumor invade la submucosa
T2	El tumor invade la muscular propia
T3	El tumor invade los tejidos pericolicos a través de la muscular propia
T4a	El tumor perfora la superficie del peritoneo visceral*
T4b	El tumor invade directamente o se adhiere a otros órganos/estructuras ^Δ
GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES (N) [◊]	
NX	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales
N0	No metástasis en ganglios linfáticos regionales
N1	Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos regionales
N1a	Metástasis en 1 ganglio linfático regional
N1b	Metástasis en 2-3 ganglios linfáticos regionales
N1c	Depósito(s) tumorales en subserosa, mesenterio o tejidos pericólicos o perirectales no peritonealizados sin metástasis ganglionares regionales
N2	Metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regionales
N2a	Metástasis en 4-6 ganglios linfáticos regionales
N2b	Metástasis en 7 o más ganglios linfáticos regionales
METÁSTASIS A DISTANCIA (M)	
M0	No metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia
M1a	Metástasis limitadas a un órgano o localización
M1b	Metástasis en más de un órgano/localización o en el peritoneo

* Tis incluye la presencia células tumorales confinadas a la membrana basal (intraepitelial) o a la lámina propia de la mucosa (intramucosa), sin extensión a la submucosa a través de la muscularis mucosae.

• La invasión directa en los estadios T4 incluye la invasión de otros órganos o segmentos colorrectales como resultado de la extensión directa a través de la serosa, confirmada mediante el examen microscópico o, en el caso de tumores de localización retroperitoneal o subperitoneal, la invasión directa de otros órganos o estructuras por extensión a través de la muscular propia.

Δ Los tumores que se adhieren microscópicamente a otros órganos o estructuras se clasifican como cT4b. Sin embargo, si no se objetiva la presencia microscópica de tumor en la adhesión, la clasificación debe ser pT1-4a dependiendo de la profundidad de la invasión transmural. La clasificación V, L o PN se emplea para identificar la presencia de invasión vascular, linfática o perineural, respectivamente.

◇ La presencia de un nódulo satélite peritumoral en el tejido adiposo pericólico o perirrectal de un carcinoma primario o en el mesenterio adyacente, sin evidencia histológica de ganglio linfático residual en el nódulo, puede representar una diseminación discontinua, una invasión venosa con diseminación extravascular (V1/2), o un ganglio linfático totalmente reemplazado por tumor (N1/2). Los ganglios reemplazados por tumor deben computarse por separado como ganglios positivos en la categoría N, mientras que la diseminación discontinua o la invasión venosa se debe clasificar en cada estadio de la enfermedad como un depósito tumoral (TD).

Tabla 2: Clasificación por estadios/grupos pronóstico (AJCC/UICC 2010)

ESTADIO	T	N	M	DUKES [‡]	MAC [‡]
0	Tis	N0	M0	-	-
I	T1	N0	M0	A	A
	T2	N0	M0	A	B1
IIA	T3	N0	M0	B	B2
IIB	T4a	N0	M0	B	B2
IIIC	T4b	N0	M0	B	B3
IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0	C	C1
	T1	N2a	M0	C	C1
IIB	T3-T4a	N1/N1c	M0	C	C2
	T2-T3	N2a	M0	C	C1/C2
	T1-T2	N2b	M0	C	C1
IIIC	T4a	N2a	M0	C	C2
	T3-T4a	N2b	M0	C	C2
	T4b	N1-N2	M0	C	C3
IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a	-	-
IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1b	-	-

‡ El estadio B de Dukes se compone de subgrupos de pacientes con mejor (T3N0M0) y peor pronóstico (T4N0M0), al igual que el estadio C (cualquier TN1M0 y cualquier TN2M0). MAC es la clasificación modificada de Astler-Coller.

2.4. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DEL CÁNCER DE COLON LOCALIZADO

La cirugía es el pilar fundamental del tratamiento de la enfermedad localizada y la única modalidad terapéutica potencialmente curativa. El objetivo debe ser la resección amplia del tumor primario con márgenes proximal y distal de al menos 5 cm junto al pedículo vascular y los ganglios linfáticos de drenaje del segmento de colon afecto. Además de su valor terapéutico, la linfadenectomía proporciona información pronóstica importante que puede ser útil para establecer la indicación de QT adyuvante⁸⁷. La mayoría de las guías de consenso internacionales recomiendan el examen histológico de al menos 12 ganglios linfáticos para considerar que el estadiaje es adecuado y el empleo de técnicas adicionales para intentar incrementar la tasa de detección si no se alcanza este número¹³. La experiencia del equipo quirúrgico es de vital importancia en el éxito de la cirugía, considerándose un factor pronóstico independiente⁸⁸.

La presencia de una obstrucción y/o perforación intestinal son complicaciones frecuentes de las neoplasias de colon cuyo tratamiento quirúrgico depende de la localización del tumor y del estado general del paciente. En los tumores obstructivos del colon ascendente y transversal, generalmente es posible realizar con seguridad una colectomía derecha o colectomía derecha ampliada con anastomosis ileocólica primaria. Sin embargo, en los tumores de colon descendente, la mayoría de los cirujanos prefieren realizar una colostomía tras la resección colónica, aunque varios estudios sugieren que la cirugía con anastomosis primaria no se asocia a un incremento significativo de la morbilidad⁸⁹. En cuanto al manejo de los tumores perforados, en los pacientes estables y con peritonitis no generalizadas, la resección del tumor con anastomosis primaria es una opción segura. Sin embargo, en los casos de peritonitis difusa, perforación libre y/o pacientes hemodinámicamente inestables, los procedimientos de elección son la colocación de un drenaje percutáneo o la realización de una colostomía proximal temporal o definitiva⁹⁰.

En cuanto a la colectomía asistida por laparoscopia, múltiples ensayos clínicos prospectivos randomizados^{91,92} y meta-análisis^{93,94} han demostrado que los resultados oncológicos y la morbilidad intra y postoperatoria son comparables a los que se obtienen con la cirugía abierta en pacientes adecuadamente seleccionados y en manos de cirujanos con experiencia en dicha técnica. Se consideran candidatos apropiados los pacientes con tumores localizados preferentemente en el colon izquierdo, sin signos de obstrucción ni perforación intestinal, sin invasión de estructuras adyacentes y sin antecedentes de una cirugía abdominal extensa que condicione la existencia de adherencias importantes. Las limitaciones del abordaje

laparoscópico incluyen un tiempo quirúrgico generalmente superior, la necesidad de una adecuada formación y destreza en el procedimiento y el coste de los equipos. Sin embargo, ofrece las ventajas potenciales de un abordaje mínimamente invasivo que conlleva menor tiempo de estancia hospitalaria, menores requerimientos analgésicos, y mejores resultados estéticos⁹². La conversión a cirugía abierta es necesaria en aproximadamente un 11-20% de los pacientes y en la mayoría de las ocasiones se relaciona con las características del tumor y la experiencia del cirujano^{95,96}.

2.5. QUIMIOTERAPIA ADYUVANTE EN CÁNCER DE COLON LOCALIZADO

2.5.1. Consideraciones generales

En pacientes con CCR sometidos a una cirugía potencialmente curativa, se considera que las recidivas de la enfermedad se originan a partir de micrometástasis clínicamente ocultas presentes en el momento del diagnóstico. El objetivo del tratamiento adyuvante es, por tanto, la erradicación de dichas micrometástasis, reduciendo así el riesgo de recidiva y aumentando la probabilidad de curación. Aunque las tasas de recurrencia son significativamente diferentes en los estadios II y III⁸⁴, la mayoría de los estudios randomizados de QT adyuvante incluyen ambos grupos de pacientes^{11,97}, realizando con frecuencia análisis exploratorios planeados con la intención de determinar la eficacia del tratamiento en cada estadio. En los estadios I no existe indicación de tratamiento adyuvante, puesto que la supervivencia a los 5 años con tratamiento quirúrgico exclusivamente es del 93-95%⁸⁴.

Diversos ensayos clínicos en la década de los 90 demostraron que la QT adyuvante basada en fluoropirimidinas asociada a levamisol o modulada con ácido folínico suponía un beneficio en la supervivencia de los pacientes con CC estadio III⁷⁻⁹. Estos resultados han sido mejorados posteriormente al asociar oxaliplatino a los esquemas con fluoropirimidinas¹⁰⁻¹². Más recientemente, se ha evaluado el valor de varios agentes biológicos como el bevacizumab^{98,99} o el cetuximab^{100,101} en combinación con la QT adyuvante, en base al beneficio demostrado en la enfermedad avanzada, pero no se ha conseguido demostrar una mejoría en el pronóstico global.

Se considera que el tratamiento adyuvante consigue una reducción absoluta del riesgo de fallecimiento del 3-5% en los estadios II cuando se utilizan fluoropirimidinas en monoterapia^{8,9} y del 15-20% en los estadios III tratados con combinaciones de fluoropirimidinas y oxaliplatino¹⁰⁻¹². Puesto que se trata de situaciones clínicas diferentes, el tratamiento adyuvante de ambos estadios se discutirá por separado.

2.5.2. QT adyuvante con fluoropirimidinas

2.5.2.1. 5-FU modulado con levamisol (LEV) o leucovorín (LV)

Los dos primeros estudios que evaluaron el beneficio del tratamiento adyuvante basado en 5-FU fueron llevados a cabo por el el North Central Cancer Treatment Group (NCCTG)/Clínica Mayo¹⁰² y por el Intergroup americano (estudio INT-0035)¹⁰³ a principios de la década de los 90. Ambos concluyeron que el tratamiento adyuvante con 5-FU+LEV durante 1 año reduce el riesgo de recaída y de muerte respecto a la observación en pacientes con estadio III¹⁰⁴ (Tabla 3).

Posteriormente, varios ensayos clínicos evaluaron la eficacia de la adyuvancia con 5-FU bolus+LV en base a la evidencia preclínica que sugiere la existencia de un sinergismo entre el 5-FU y el LV al formar un complejo ternario con la enzima timidilato sintetasa (TS) que conlleva una inhibición más prolongada de la misma por 5-FU (Tabla 3)^{7-9,105-110}. En todos ellos se objetivó que la QT adyuvante con el esquema de Roswell Park (4 ciclos de 5-FU bolus y LV, ambos a dosis 500 mg/m² semanal durante 6 semanas seguidas de 2 semanas de descanso)¹⁰⁵ o Clínica Mayo (6 ciclos de 5-FU 425 mg/m² bolus+LV 20 mg/m², ambos administrados durante los días 1-5 cada 4-5 semanas)^{8,9} mejoraba de forma significativa la SLE y la supervivencia global (SG) cuando se compara con el seguimiento^{8,9} o el esquema 5-FU+LEV¹⁰⁵, mientras que la adición de LEV a 5-FU+LV no suponía ningún beneficio adicional¹⁰⁵.

Otros trabajos han demostrado la equivalencia de las dosis altas y bajas de LV en combinación con 5-FU¹⁰⁶⁻¹¹⁰, así como la ausencia de beneficio de una QT adyuvante prolongada (9-12 meses) respecto a una de duración inferior (3-6 meses) (Tabla 3)^{106,107,109,110}. Teniendo en cuenta estos resultados, los esquemas NCCTG/Clínica Mayo o Roswell Park durante 6-8 meses fueron considerados tratamiento adyuvante estándar a partir de mediados de la década de los 90.

2.5.2.2. Esquemas de 5-FU: bolus versus infusión continua

Al menos cuatro ensayos fase III han demostrado que los esquemas de QT adyuvante basados en 5-FU en infusión continua presentan una eficacia similar y un perfil de toxicidad más favorable que aquellos basados en 5-FU bolus¹¹¹⁻¹¹⁵. Destacan dos estudios europeos, el Pan-European Trial Adjuvant Colon Cancer (PETACC)-2¹¹⁴, en el que se utilizan tres regímenes diferentes de 5-FU en infusión continua con o sin LV (español del grupo español de tumores digestivos TTD, AIO o de Gramont), y el

GERCOR C96.1¹¹², en el se emplea el esquema de De Gramont (LV 200 mg/m² seguido de 5-FU bolus 400 mg/m² y 5-FU 600 mg/m² en infusión continua de 22 horas los días 1 y 2, cada 14 días). Los resultados de ambos se resumen en la Tabla 3.

En base a estos datos, muchos clínicos consideran los esquemas de 5-FU en infusión continua como el tratamiento adyuvante de elección, así como un brazo control óptimo para los ensayos con oxaliplatino que se describirán posteriormente.

2.5.2.3. Fluoropirimidinas orales: capecitabina y UFT

Aunque en un meta-análisis japonés inicial el impacto en supervivencia conseguido con las fluoropirimidinas orales en adyuvancia es inferior al logrado con los esquemas basados en 5-FU¹¹⁶, varios estudios más recientes sugieren que la magnitud del beneficio obtenido con capecitabina o UFT es similar a la que se consigue con 5-FU en bolus (Tabla 3)¹¹⁷⁻¹¹⁹. Así, el ensayo europeo/canadiense X-ACT ha demostrado que la eficacia de 6 meses de tratamiento adyuvante con capecitabina (1250 mg/m²/12 horas días 1-14 en ciclos de 21 días) es al menos equivalente a la de 5-FU bolus (Clínica Mayo) en CCR estadio III, manteniéndose el beneficio en todos los subgrupos, incluidos los pacientes ≥ 70 años¹¹⁷. Además, en un análisis planeado se demostró una clara tendencia hacia una SLE y SG superior¹¹⁸. Aunque la mitad de los pacientes tratados con capecitabina requirieron reducción de dosis por toxicidad, la incidencia de efectos adversos fue significativamente inferior que con 5-FU/LV, con la excepción del síndrome mano-pié y la hiperbilirrubinemia. Estos resultados supusieron la aprobación de la este fármaco para el tratamiento adyuvante del CC.

Un segundo estudio, NSABP C-06, tampoco encontró diferencias significativas en la SLE ni en la SG a 5 años cuando se comparó 5-FU/LV según el esquema de Roswell Park con UFT/LV oral en CC estadios II y III¹¹⁹. El perfil de toxicidad y los parámetros de calidad de vida fueron similares, pero el tratamiento con UFT/LV resultó más cómodo para los pacientes¹²⁰.

La eficacia superponible de las fluoropirimidinas orales y del 5-FU bolus, junto con su perfil de toxicidad favorable y la comodidad de la administración oral, hacen de estos fármacos el tratamiento de elección en los pacientes en los que se considera tratamiento adyuvante con fluoropirimidinas en monoterapia. No obstante, es preciso tener en cuenta que no se ha comparado con esquemas mejor tolerados como los basados en 5-FU en infusión continua.

Introducción

Tabla 3: Principales ensayos de QT adyuvante con fluoropirimidinas

ESTUDIO AUTOR/AÑO	POBLACIÓN TRATAMIENTO	SLE	SG
NCCTG (Laurie JA, 1989 ¹⁰²)	N= 401 (139 II, 262 III) Observación LEV 12 meses 5FU bolus+LEV	SLE 3 años 58% 62% (HR=0.73; p=0.08) 77% (HR=0.69; p=0.003)	SG 3 años 67% 78% (HR=0.82; p=0.12) 82% (HR=0.87; p=0.09)
INT-0035 (Moertel CG, 1990 ¹⁰³)	N= 1296 (325 II, 971 III) Observación LEV 5FU bolus+LEV	SLE 3.5 años, estadio III 47% 49% (HR=0.88; p=0.64) 63% (HR=0.59; p<0.001)	SG 3 años, estadio III 57% 58% (HR=0.97; p=0.71) 77% (HR=0.67; p=0.006)
NSABP C-03 (Wolmark N, 1993 ⁷)	N= 1081 (290 II, 791 III) MOF 5FU bolus+LV RP	SLE 3 años 64% 73% (HR=0.70; p=0.0004)	SG 3 años 77% 84% (HR=0.68; p=0.003)
NSABP C-04 (Wolmark N, 1999 ¹⁰⁵)	N= 2151 (882 II, 1269 III) 5FU bolus+LEV 5FU bolus+LV RP 5FU bolus LEV+LV	SLE 5 años 60% 65% (HR=0.84; p=0.04) 64% (HR=0.91; p=0.13)	SG 5 años 70% 74% (HR=0.85; p=0.07) 73% (HR=0.93; p=0.11)
IMPACT (1995 ⁸)	N= 1526 (854 II, 672 III) Observación 5FU bolus+LV	SLE 3 años 62% 71% (HR=0.65; p<0.0001)	SG 3 años 78% 83% (HR=0.78; p=0.029)
INT 0089 (Haller DG, 2005 ¹⁰⁷)	N= 3561 (694 II, 2867 III) 5FU+LEV 1 año 5FU+LV Mayo 6 m 5FU+LV RP 6 m 5FU bolus+LV+LEV	SLE 5 años 55% 60% 58% 49% (no diferencias)	SG 5 años 64% 66% 66% 54% (no diferencias)
PETACC-2 (Köhne CH, 2013 ¹¹⁴)	N= 1601 (estadio III) 5FU+LV Mayo LV5FU2	SLE 5 años 67.1% 62.7% (HR=0.997; p=0.98)	SG 3 años 78.9% 78.9%(HR=0.96;p=0.74)
GERCOR C96.1 (André T, 2007 ¹¹²)	N= 905 (389 II, 516 III) 5FU+LV altas dosis LV5FU2	SLE 3 años 65% 66% (HR=1.01; p=0.74)	SG 3 años 78% 76% (HR=1.02; p=0.91)
X-ACT (Twelves C, 2005 ¹¹⁷ y 2009 ¹¹⁸)	N=1987 (estadio III) 5FU+LV Mayo Capecitabina	SLE 5 años 56.7% 60.8% (HR=0.88; p<0.001)	SG 5 años 68.4% 71.4% (HR=0.86;p<0.01)
NSABP C-06 (Lembersky BC, 2006 ¹¹⁹)	N= 1608 (755 II, 853 III) 5FU+LV RP UFT+LV	SLE 3 años 68.3% 66.9% (HR=1.004; p=0.79)	SG 3 años 78.7% 78.7% (HR=1.01; p=0.52)

MOF: Lomustina+vincristine+5-FU; RP: Roswell Park; LV5FU2: Esquema de De Gramont

2.5.3. QT adyuvante basada en oxaliplatino

El oxaliplatino es el único derivado del platino con actividad en CCR. Tres grandes estudios fase III han demostrado un beneficio en supervivencia al combinar este fármaco con la QT adyuvante basada en fluoropirimidinas en pacientes con CC con afectación ganglionar (Tabla 4)^{10-12,97,121}.

El estudio europeo MOSAIC (Multicenter Internacional Study of Oxaliplatin/5-FU in the adjuvant treatment of Colon Cancer) fue el primero que evaluó el papel del oxaliplatino en adyuvancia. Se aleatorizaron 2246 pacientes con CC en estadio II (40%) y III (60%) a recibir 6 meses de tratamiento con LV5FU2 (esquema de de Gramont) o FOLFOX-4 (esquema de de Gramont+oxaliplatino 85 mg/m² día 1 cada 14 días)¹⁰. Con una mediana de seguimiento de 81.9 meses, la SLE a 5 años, objetivo primario del estudio, fue significativamente superior en los pacientes tratados con FOLFOX-4 que en aquellos tratados con el esquema de de Gramont (73.3% versus 67.4%; p=0.003), al igual que ocurre con la SG a los 6 años (78.5% versus 76%; p=0.046)⁹⁷. En el análisis de subgrupos, se confirmó un beneficio en SLE (SLE 6 años, 66% versus 59%; p=0.05) y SG (SG a los 6 años, 72.9% versus 68.7%; p=0.023) en los pacientes con CC estadio III tratados con FOLFOX-4, mientras que en aquellos con estadio II no se evidenciaron diferencias entre los dos brazos de tratamiento. Respecto a la toxicidad, la neutropenia febril (1.8% versus 0.2%) y la diarrea grado 3-4 (10.8% versus 6.6%) fueron más frecuentes en el brazo de FOLFOX-4. Aunque el 92% de los pacientes tratados con oxaliplatino desarrolló neuropatía periférica, ésta fue grado 3 en sólo el 13% de los casos y generalmente reversible. La incidencia de neuropatía grado 1, 2 y 3 a los 48 meses de finalizar el tratamiento fue del 12, 3 y 0.7%, respectivamente. En base a estos resultados, el oxaliplatino fue aprobado en combinación con 5-FU/LV en el tratamiento adyuvante del CC estadio III. Aunque FOLFOX-4 ha sido el esquema utilizado en el estudio de registro, en ocasiones se prefiere utilizar FOLFOX-6 modificado, que no requiere el bolus de 5-FU del segundo día, o FOLFOX-7 modificado, que elimina por completo dicho bolus y es menos mielotóxico.

Un segundo estudio americano, el NSABP C-07, confirmó el beneficio de añadir oxaliplatino a 5-FU/LV en el contexto adyuvante. Se randomizaron 2407 pacientes con CC estadio II (29%) y III (71%) a recibir tratamiento con 3 ciclos de 5-FU/LV semanal en bolus (esquema Roswell Park) con o sin oxaliplatino 85 mg/m² las semanas 1,3 y 5 de ciclos de 8 semanas (esquema FLOX)¹¹. Con una mediana de seguimiento de 96 meses, la SLE a los 5 años, objetivo primario del estudio, fue significativamente superior en los pacientes tratados con FLOX (69.4% versus 64.2%; p=0.002), pero no

se encontraron diferencias significativas en SG entre los dos grupos (SG 5 años, 80.2% versus 78.4%; $p=0.08$)¹²¹. En el análisis exploratorio por estadios, al igual que en el estudio MOSAIC, el beneficio en supervivencia del tratamiento con oxaliplatino se limita a los pacientes con estadio III, sin objetivarse diferencias significativas en los estadios II. Respecto a la toxicidad, la incidencia de emesis grado 3-4 (13% versus 9%), neuropatía sensorial grado 3 (8.2% versus 0.2%) y hospitalizaciones secundarias a diarrea y deshidratación (5.5% versus 3%) fue significativamente superior en el brazo de FLOX. En total, el 85.4% de los pacientes tratados con oxaliplatino presentaron neuropatía durante el tratamiento y el 29.4% a los 12 meses de finalizar el mismo, siendo ésta grado 3 en el 0.5% de los casos¹¹. Finalmente, al comparar la toxicidad entre estudios se comprobó que la incidencia de diarrea grado 3-4 en pacientes tratados con FLOX fue significativamente superior que la de aquellos tratados con FOLFOX en el estudio MOSAIC¹⁰ (38% versus 10.8%; $p=0.003$).

El estudio XELOXA (NO16968) comparó la eficacia de 6 meses de adyuvancia con esquema CAPOX (oxaliplatino 130 mg/m² día 1 y capecitabina 1000 mg/m²/12 horas durante 14 días en ciclos de 21 días) respecto a 5-FU/LV bolus (Clínica Mayo o Roswell Park) en 1886 pacientes con CC estadio III. En la última actualización, con una mediana de seguimiento de 74 meses, tanto la SLE (SLE 7 años, 63% versus 56%; $p=0.0038$) como la SG (SG 7 años, 73% versus 67%; $p=0.83$) fueron significativamente superiores en el brazo de CAPOX¹². El perfil de toxicidad fue manejable. El esquema CAPOX se asoció con menor incidencia de neutropenia grado 3-4 (9% versus 16%), fiebre neutropénica (<1% versus 4%), estomatitis (<1% versus 9%) y alopecia (4% versus 20%) que 5-FU/LV, pero con una mayor neurotoxicidad (78%, 11% grado 3-4 versus 8%, <1% grado 3-4), eritrodisestesia palmo-plantar grado 3-4 (5% versus <1%) y trombopenia grado 3-4 (5% versus <1%)¹²².

Finalmente, el beneficio del oxaliplatino adyuvante se confirma en un análisis de los datos de cinco estudios observacionales en pacientes <75 años con CC estadio III tratados asistencialmente¹²³. Se comparó el pronóstico de 4.060 pacientes diagnosticados durante 2004-2009 no incluidos en ensayos clínicos con el de 8292 pacientes participantes en 5 ensayos randomizados, objetivándose que la adyuvancia con oxaliplatino mejora la SG a 3 años en ambos grupos: HR=0.70 [intervalo de confianza (IC) 95%, 0.60-0.82; $p<0.001$] y HR=0.80 (IC 95%, 0.70-0.92; $p=0.002$), respectivamente.

En base a estos resultados, se recomienda el empleo de QT adyuvante basada en oxaliplatino y fluoropirimidinas en los pacientes con CCR estadios III elegibles para

recibir dicho tratamiento. Una revisión sistemática de los datos individuales de 8734 pacientes incluidos en 4 estudios randomizados (NSABP C-08, XELOXA, X-ACT y AVANT) concluye que el impacto en el pronóstico conseguido con este fármaco es independiente de la fluoropirimidina con la que se combina (5-FU/LV o capecitabina)¹²⁴. En general, los esquemas con 5-FU en infusión continua (FOLFOX) o fluoropirimidinas orales (CAPOX) son de elección frente al tratamiento con 5-FU en bolus (FLOX) por su perfil de toxicidad favorable. En caso que aparezca neuropatía clínicamente relevante, se debe suspender el oxaliplatino y continuar con las fluoropirimidinas en monoterapia, ya que son responsables de aproximadamente dos tercios del efecto terapéutico de FOLFOX/CAPOX adyuvante.

Tabla 4: Ensayos clínicos de QT adyuvante basada en oxaliplatino

ESTUDIO AUTOR/AÑO	POBLACIÓN TRATAMIENTO	SLE	SG
MOSAIC (André T, 2004 ¹⁰ y 2009 ⁹⁷)	N= 2246 (899 II y 1347 III) LV4FU2 FOLFOX4	SLE 5 años 67.4% 73.3% (HR=0.80; IC 95%,0.68-0.93; p=0.003) Estadio III: 58.9% vs. 66.4% (HR=0.78; IC 95%, 0.65-0.93; p=0.005) Estadio II: 79.8% vs. 83.7% (HR=0.84; IC 95%, 0.62-1.14; p=0.258)	SG 6 años 76% 78.5% (HR=0.84; IC 95%,0.71-1; p=0.046) Estadio III: 68.7% vs. 72.9% (HR=0.80; IC 95%, 0.65- 0.97; p=0.023) Estadio II: 86.9% vs. 86.8% (HR=1; IC 95%, 0.70-1.41; p=0.986)
NSABP C-07 (Kuebler JP, 2007 ¹¹ , Yothers G, 2011 ¹²¹)	N= 2409 (699 II y 1710 III) FULV bolus FLOX	SLE 5 años 64.2% 69.4% (HR=0.82; IC 95%,0.72-0.93; p=0.002) Estadio III: 57.8% vs. 64.4% (HR=0.78; IC 95%, 0.68-0.90; p<0.001) Estadio II: 80.1% vs. 82.1% (HR=0.94; IC 95%, 0.70-1.26; p=0.67)	SG 5 años 78.4% 80.2% (HR=0.88; IC 95%,0.75-1.02; p=0.08) Estadio III: 73.8% vs. 76.5% (HR=0.85; IC 95%, 0.65- 0.97; p=0.023) Estadio II: 89.7% vs. 89.6% (HR=1.04; IC 95%, 0.72- 1.50; p=0.84)
XELOXA (NO16968) (Schmoll H, 2007 ¹² , Haller DG, 2011 ¹²²)	N= 1886 (estadio III) FULV bolus CAPOX	SLE 3 años 66.5% 70.9% (HR=0.80; IC 95%,0.69-0.93; p=0.0045)	SG 5 años 74.2% 77.6% (HR=0.87; IC 95%,0.72-1.05; p=0.1486)

Introducción

2.5.4. QT adyuvante basada en irinotecán

La QT basada en irinotecán no se considera una aproximación estándar en el tratamiento adyuvante del CC en base a los resultados negativos de cuatro estudios fase III en los que se ha comparado la eficacia de la combinación de irinotecán+5-FU/LV con la de las fluoropirimidinas en monoterapia (Tabla 5)¹²⁵⁻¹²⁸.

Tabla 5: Ensayos clínicos de CT adyuvante basada en irinotecán

ESTUDIO AUTOR/AÑO	POBLACIÓN TRATAMIENTO	SLE	SG
CALGB 89803 (Saltz LB, 2007 ¹²⁵)	N= 1264 (estadio III) FULV bolus semanal IFL	SLE 5 años 61% 59% (HR=ND; p=0.85)	SG 6 años 71% 68% (HR=ND; p=0.74)
Hellenic Cooperative Oncology Group (Papadimitriou CA, 2011 ¹²⁶)	N= 873 (425 II, 448 III) FULV bolus semanal IFL	SLE 5 años 68% 70% (HR=ND; p=0.436)	SG 6 años 76% 78% (HR=ND; p=0.334)
PETACC-3 (Van Cutsem E, 2009 ¹²⁷)	N= 2974 (880 II, 2094 III) LV5FU2 FOLFIRI	SLE 5 años estadio III 54.3% 56.7% (HR=0.90; IC 95%, 0.79-1.02; p=0.106)	SG 5 años estadio III 71.3% 73.8% (HR=0.88; IC 95%, 0.76-1.04; p=0.094)
ACCORD02 (Ychou M, 2009 ¹²⁸)	N= 400 (estadio III) LV5FU2 FOLFIRI	SLE 3 años 60% 51% (HR=1.12; IC 95%, 0.85-1.47; p=0.42)	SG 5 años 67% 61% (HR=1.20; IC 95%, 0.87-1.67; p=0.26)

IFL: 5-FU bolus 500 mg/m², LV 20 mg/m² e irinotecán 125 mg/m² semanal durante 4 semanas, con 2 semanas de descanso durante un total de 30 semanas; FOLFIRI: Irinotecán 180 mg/m² día 1, LV 200 mg/m² seguido de 5-FU bolus 400 mg/m² y 5-FU 600 mg/m² en infusión continua de 22 horas los días 1 y 2, cada 14 días; ND: No disponible.

2.5.5. Tratamiento adyuvante con terapias dirigidas

Las terapias dirigidas tampoco desempeñan en la actualidad un papel relevante en el tratamiento adyuvante del CC, ya que los estudios que han evaluado el beneficio potencial de asociar bevacizumab^{98,99,129} o cetuximab^{100,101} a la QT han sido negativos

(Tabla 6), lo que probablemente pueda explicarse por las diferentes características biológicas de los tumores localizados y la enfermedad diseminada¹³⁰.

Tabla 6: Ensayos clínicos de tratamiento adyuvante con terapias dirigidas

ESTUDIO	POBLACIÓN	SLE	SG
AUTOR/AÑO	TRATAMIENTO		
BEVACIZUMAB			
NSABP C-08 (Allegra CJ, 2011 ⁹⁸ y 2013 ¹²⁹)	N= 2673 (666 II y 2007 III)	SLE 3 años	SG 5 años
	FOLFOX6 modificado(m) FOLFOX6m+Bevacizumab	75.1% 77.9% (HR=0.93; IC 95%,0.81-1.08; p=0.35)	80.7% 82.5% (HR=0.95; IC 95%,0.79-1.13; p=0.56)
AVANT (De Gramont A, 2012 ⁹⁹)	N= 2673 (584 II y 2867 III)	SLE 3 años	SG 5 años
	FOLFOX4 modificado (m) FOLFOX4m+Bevacizumab CAPOX+Bevacizumab	76% 73% (HR=1.17; IC 95%,0.98-1.39; p=0.07) 75% (HR=1.07; IC 95%,0.90-1.28; p=0.44)	85% 81% (HR=1.27; IC 95%,1.03-1.57; p=0.02) 82% (HR=1.15; IC 95%,0.93-1.42; p=0.21)
CETUXIMAB			
NCCTG N0147 (Alberts SR, 2012 ¹⁰⁰)	N= 2686 (estadio III)	SLE 3 años	SG 3 años
	2070 KRAS wild-type (WT), 717 KRAS mutado mFOLFOX6 mFOLFOX6+Cetuximab	KRAS WT: 74.6% vs. 71.5% (HR=1.21; IC 95%, 0.98-1.49; p=0.08) KRAS mutado: 67.1% vs. 65% (HR=1.12; IC 95%, 0.86-1.46; p=0.38)	KRAS WT: 87.3% vs. 85.6% (HR=1.25; IC 95%, 0.92-1.68; p=0.15) KRAS mutado: 87.9% vs. 82.7% (HR=1.27; IC 95%, 0.85-1.92; p=0.25)
PETACC-8 (Taieb J, 2014 ¹⁰¹)	N= 2559 (estadio III)	SLE 3 años	SG 3 años
	1602 KRAS exón 2 WT, 742 KRAS mutado FOLFOX4 FOLFOX4+Cetuximab	KRAS WT: 78% vs. 75.1% (HR=1.05; IC 95%, 0.85-1.29; p=0.66) KRAS mutado: 71% vs. 70.7% (HR=1.06; IC 95%, 0.82-1.37; p=0.65)	KRAS WT: 90.5% vs. 88.3% (HR=1.09; IC 95%, 0.81-1.47; p=0.56) KRAS mutado: 88.1% vs. 87.2% (HR=1.06; IC 95%, 0.73-1.53; p=0.76)

2.5.6. QT adyuvante en el CC estadio II

Aunque el beneficio de la QT adyuvante ha quedado claramente demostrado en el CCR estadio III^{10-12,97,118,121-123}, su utilidad en los estadios II continúa siendo controvertida, a pesar de los múltiples estudios que han evaluado esta cuestión.

2.5.6.1. Beneficio de la QT adyuvante basada en fluoropirimidinas

Como se ha comentado anteriormente, la mayoría de los estudios con QT adyuvante basada en fluoropirimidinas han incluido pacientes con CC estadios II y III^{8,9,103,131} y han demostrado una mejora de la supervivencia respecto al tratamiento quirúrgico exclusivo en el conjunto de la población estudiada. No obstante, en casi todos los casos, dicho beneficio fue significativo sólo en los estadios III.

Tres grandes estudios randomizados han evaluado específicamente el impacto de la QT adyuvante con fluoropirimidinas en una población constituida completa o predominantemente por pacientes con CCR estadio II¹³¹⁻¹³³. El estudio QUASAR es el que incluye el mayor número de pacientes con dicho estadio (91% del total de la población estudiada) y el único que ha demostrado un beneficio pequeño pero significativo tanto en SLE (HR=0.78; p=0.001) como en SG (HR=0.82; p=0.008) en el grupo tratado con 5-FU/LV adyuvante respecto a la observación. Sin embargo, en los pacientes con CC estadio II, las diferencias en SG a los 5 años no alcanzaron la significación estadística (83.9% versus 81.5%; HR=0.86; p=0.12)¹³².

El beneficio de la adyuvancia basada en fluoropirimidinas en CC estadio II también ha sido evaluado en varios meta-análisis^{8,24,131-139}. En los estudios iniciales, la QT adyuvante se asoció con una discreta mejoría de la SLE que oscila entre el 5% y el 10%, pero que no se traduce en un beneficio significativo en la SG¹³⁴⁻¹³⁶. Un meta-análisis más reciente sugiere un impacto pronóstico positivo del tratamiento adyuvante tanto en la SLE (HR=0.86; IC 95%, 0.75-0.98) como en la SG a los 5 años (HR=0.81; IC 95%, 0.75-0.98), aunque en los ensayos incluidos se utilizaban esquemas de QT diferentes, algunos de los cuales no se recomiendan actualmente en adyuvancia. Sin embargo, en un segundo meta-análisis publicado en 2011 en el que se analizan los datos de más de 24.000 pacientes con CC estadio II incluidos en la base de datos SEER no se objetiva una mejoría de la SG a los 5 años en el grupo tratado con QT adyuvante respecto al grupo de seguimiento, incluso cuando se consideran los pacientes con uno o más factores de mal pronóstico (HR=1.03; IC 95%, 0.94-1.13)¹³⁹.

2.5.6.2. Beneficio de la QT adyuvante basada en oxaliplatino

Se disponen de pocos datos acerca del beneficio de la QT adyuvante basada en oxaliplatino en pacientes con CC estadio II^{97,121,140,141}. En el estudio MOSAIC^{10,97} se incluyeron 899 pacientes con estadios II de los que 569 (63%) fueron clasificados como de alto riesgo por la presencia de al menos una de las siguientes características:

estadio T4, obstrucción intestinal o perforación al diagnóstico, tumor pobremente diferenciado, invasión venosa o menos de 10 ganglios linfáticos examinados. En un análisis exploratorio reciente, con una mediana de seguimiento de 81.9 meses¹⁴¹, la SLE en los pacientes tratados con FOLFOX4 fue discreta pero no significativamente superior a la del grupo de seguimiento (SLE a 5 años, 84% versus 80%, respectivamente; HR=0.84; p=0.258) y la SG fue idéntica en ambos brazos (SG a 5 años 87%; HR=1; p=0.986). En los pacientes considerados de alto riesgo, la magnitud del impacto que se consigue con la adición de oxaliplatino al esquema 5-FU/LV es algo superior, pero, debido al pequeño número de pacientes, el beneficio absoluto del 8% en la SLE a 5 años (82.3% versus 74.4%; HR=0.72; p=0.063) y del 2% en la SG a 6 años (85% versus 83.3%; HR=0.91; p=0.648) no alcanza la significación estadística.

En el análisis de subgrupos del estudio NSABP C-07^{11,121}, los pacientes con estadio II tratados con oxaliplatino presentaron un beneficio menos evidente en SLE que la población global (SLE a los 4 años, 82.1% versus 80.1%, respectivamente; HR=0.94; p=0.67), sin objetivarse tampoco diferencias significativas en SG (SG a los 6 años, 89.7% versus 89.6%, respectivamente; HR=1.04; p=0.84). Es importante destacar que ni el estudio MOSAIC^{10,97} ni el NSABP C-07^{11,121} se diseñaron específicamente para evaluar el beneficio de la adyuvancia con oxaliplatino en los pacientes con estadio II. De manera similar a lo que ocurre en los análisis de subgrupos de los estudios con fluoropirimidinas, el pequeño número de pacientes evaluados disminuye la capacidad de detectar un beneficio discreto del oxaliplatino adyuvante en esta población.

2.5.6.3. Estratificación del riesgo

En base a los datos descritos, no se dispone de una evidencia concluyente acerca del beneficio global de la QT adyuvante en los pacientes con CC estadio II^{132-135,139-142}. Por ello, los esfuerzos en investigación en los últimos años han ido dirigidos a la identificación de factores pronósticos clínico-patológicos y marcadores moleculares que permitan seleccionar a aquellos pacientes con un mayor riesgo de recaída que podrían obtener un mayor beneficio de la QT adyuvante.

Como se ha comentado anteriormente en relación con el estudio MOSAIC¹⁴¹, las características clínico-patológicas asociadas con un pronóstico desfavorable en los pacientes con CC estadio II son los estadios T4^{24,143}, la histología pobremente diferenciada (incluida los tumores mucinosos y en anillo de sello)^{135,144-146}, la invasión linfovascular^{21,143} y perineural^{22,23,143}, la obstrucción y/o perforación intestinal en el momento del diagnóstico¹⁵, los márgenes positivos, indeterminados o próximos, la

identificación de <12-14 ganglios en la pieza quirúrgica^{17,18,28,29,147}, los niveles séricos de CEA preoperatorio elevados^{24,25,64,65,148-150} y las micrometástasis ganglionares ocultas detectadas por métodos moleculares o inmunohistoquímicos^{19,20,151}. Sin embargo, no existe evidencia de que los pacientes con factores de mal pronóstico se beneficien en mayor medida de la QT adyuvante, ya que los datos procedentes de los estudios que han evaluado esta cuestión en CC estadio II de alto riesgo no son concluyentes^{9,121,135,139,141}. El estudio del NCCTG, el único que restringió el empleo de 5-FU adyuvante a pacientes con estadios III y II de alto riesgo definidos por la presencia de perforación intestinal y/o adherencia/invasión a estructuras adyacentes⁹, evidenció un claro beneficio del tratamiento en el conjunto de la población de estudio, pero los resultados no se estratificaron de acuerdo con el estadio inicial. Sin embargo, en el análisis combinado del Intergroup americano, el pronóstico de los pacientes con tumores T4 de alto riesgo con ganglios negativos tratados con 5-FU adyuvante no fue significativamente superior que el del grupo tratado exclusivamente con cirugía (SG 5 años, 72% versus 69%)¹³⁵. Finalmente, el análisis combinado de los pacientes con CCR estadio II y III incluidos en la base de datos del SEER tampoco demostró beneficio en supervivencia en los estadio II tratados con QT adyuvante basada en fluoropirimidinas independientemente de la presencia o no de factores de riesgo¹³⁹.

En cuanto a la adyuvancia con oxaliplatino, como se ha descrito previamente, el estudio MOSAIC demostró una tendencia hacia una mejor SLE en pacientes con estadio II de alto riesgo tratados con FOLFOX, aunque no se tradujo en un beneficio en SG¹⁴¹. Por el contrario, un análisis combinado de 4 protocolos de QT adyuvante del grupo NSABP (NSABP C05-C08) sí demostró un beneficio en la SG a 5 años del 2-3% con la adición de oxaliplatino a la QT con 5-FU en 3.000 pacientes con estadio II¹²¹.

A pesar de la ausencia de datos de estudios randomizados que avalen el beneficio del tratamiento adyuvante en pacientes con alguno de los factores de riesgo descritos¹⁵², las guías de consenso de la Sociedad Americana de Oncología (ASCO)¹⁴, del National Comprehensive Cancer Network (NCCN)¹⁵³ y de la Sociedad Europea de Oncología (ESMO)¹³, recomiendan valorar la indicación de QT adyuvante al menos con 5-FU en monoterapia en los pacientes con CC estadio II con buen estado general y sin comorbilidades relevantes considerados de alto riesgo por la presencia de al menos uno de los siguientes factores de mal pronóstico: ≤ 12 ganglios linfáticos identificados en la pieza quirúrgica, lesiones T4, obstrucción o perforación intestinal al diagnóstico, invasión linfovascular o perineural o histología pobremente diferenciada. Se puede considerar que los pacientes con un CEA preoperatorio elevado presentan un riesgo

de recurrencia superior al promedio^{24,25,64,65,148-150}, lo cual puede influir en la decisión de administrar QT adyuvante, particularmente en presencia de otros factores de riesgo. No obstante, las guías de ASCO concluyen que los datos disponibles son insuficientes para avalar el empleo rutinario de los niveles de CEA preoperatorios en la selección de pacientes candidatos a tratamiento adyuvante¹⁴. La adición de oxaliplatino a los esquemas basados en fluoropirimidinas puede valorarse fundamentalmente en el caso de pacientes jóvenes o con múltiples factores de riesgo¹³.

Los factores moleculares con valor pronóstico y predictivo de respuesta a la QT adyuvante se desarrollarán en apartados sucesivos.

3. DETERMINANTES PRONÓSTICOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS EN LOS ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER COLORRECTAL

El pronóstico de un paciente diagnosticado de un CCR localizado viene determinado fundamentalmente por su estadio patológico, el tratamiento recibido y la biología de la neoplasia. En ausencia de tratamiento adyuvante, aproximadamente el 50-60% de todos los pacientes con enfermedad resecable se curará con el tratamiento quirúrgico exclusivo, mientras que el 40-50% restante recaerá. La QT adyuvante permite rescatar a aproximadamente un 15-20% de los pacientes que desarrollarían una recaída, incrementando la supervivencia a los 5 años hasta un 70-75%^{104,107,138}.

En la actualidad, la herramienta más potente para establecer el pronóstico tras una cirugía potencialmente curativa es el análisis anatomopatológico de la pieza quirúrgica. La clasificación TNM incorpora solamente elementos relacionados con la extensión anatómica del tumor. Sin embargo, en los últimos años se ha identificado un número creciente de factores clínicos, patológicos y moleculares con valor pronóstico, algunos de los cuales pueden influir en las decisiones terapéuticas.

3.1. FACTORES PRONÓSTICO CLÍNICOS

3.1.1. Edad

La incidencia de CCR en pacientes jóvenes (20-40 años) se ha incrementado en los últimos 25 años^{3,4,154,155}. Varios estudios han objetivado que el CCR en esta población tiene peor pronóstico, lo cual podría explicarse por la mayor incidencia de tumores con

Introducción

características histológicas desfavorables (pobrementemente diferenciados, histología mucinosa o células en anillo de sello) y diagnosticados en estadios más avanzados, así como por la menor adherencia a los programas de screening^{154,156,157}. Sin embargo, otros trabajos demuestran que a igualdad de estadio, no existen diferencias en la supervivencia cáncer específica respecto a pacientes de mayor edad^{158,159}.

Los pacientes ancianos con buena situación funcional obtienen el mismo beneficio de la adyuvancia con fluoropirimidinas que la población más jóvenes, siendo más dudoso el papel del oxaliplatino. Se ha objetivado un modesto incremento de los eventos adversos hematológicos, sin diferencias significativas en otras toxicidades^{160,161}.

3.1.2. Sexo

Aunque los datos publicados no son concluyentes, pequeños análisis exploratorios de estudios con QT adyuvante basada en fluoropirimidinas sugieren que las mujeres, fundamentalmente las <50 años, presentan un mejor pronóstico que los varones de la misma edad¹⁶²⁻¹⁶⁵. Se ha postulado que el efecto protector de los estrógenos en relación con el desarrollo de tumores con inestabilidad de microsatélites (IMS) alta (IMS-H) podría explicar estas diferencias^{163,164}. Además, varios estudios y meta-análisis han demostrado que la incidencia de toxicidad severa por fluoropirimidinas es superior en el sexo femenino, particularmente la mucositis y leucopenia^{166,167}.

3.1.3. Etnia

La mayoría de los estudios indican que la población afroamericana presenta una mayor incidencia de CCR, mayor frecuencia de tumores avanzados y de alto grado y una mortalidad superior que la caucásica¹⁶⁸⁻¹⁷⁶, mientras que los pacientes asiáticos tienen un pronóstico más favorable¹⁶⁸⁻¹⁷³. Estas diferencias pueden explicarse por muchos factores, como la biología tumoral^{173,177,178}, la variabilidad en el estatus económico^{179,180} y en la accesibilidad al sistema sanitario¹⁸¹⁻¹⁸⁶, programas de screening endoscópico^{184,185}, tratamiento quirúrgico y QT adyuvante¹⁸² o medidas de seguimiento^{183,184}, así como las variaciones farmacogenéticas en las enzimas metabolizadoras de fármacos existentes entre los distintos grupos étnicos^{186,187}.

3.1.4. Obesidad y trastornos metabólicos

Aunque la obesidad y otros trastornos metabólicos asociados (hipertensión arterial, resistencia a la insulina, dislipemia) son factores de riesgo consistentes en CCR¹⁸⁸⁻¹⁹¹,

su valor pronóstico está menos establecido^{192,193}. Sin embargo, a pesar de los resultados discordantes de algunos trabajos^{194,195}, la mayoría de los estudios de QT adyuvante en estadios II-III han demostrado que los pacientes con obesidad, presentan un incremento significativo del riesgo de recidiva y una supervivencia inferior que aquellos con un índice de masa corporal normal^{193,196,197}.

Los mecanismos biológicos que relacionan la obesidad con el pronóstico del CCR no están completamente aclarados^{189,198}, aunque se han postulado como probables el efecto proliferativo y antiapoptótico de la hiperinsulinemia, la resistencia a la insulina^{199,200}, el síndrome metabólico¹⁹², el incremento de los niveles de adipocitoquinas²⁰¹, los estados de inflamación crónica^{199,202}, el estrés oxidativo²⁰³, la respuesta inmune deficiente²⁰⁴ o la menor sensibilidad a los agentes antiangiogénicos²⁰⁵ en los pacientes obesos.

3.2. FACTORES PRONÓSTICO PATOLÓGICOS

3.2.1. Estadio patológico

Como se ha comentado, la herramienta clínica con mayor utilidad pronóstica tras la cirugía del CCR es el estadio patológico. La Tabla 7 resume la supervivencia a los 5 años en función del mismo según la clasificación TNM (AJCC/UICC 2010)⁸⁵.

Tabla 7: Supervivencia a los 5 años en 28.491 pacientes con adenocarcinoma de colon (SEER 1973-2005)

ESTADIO	AÑOS DESDE EL DIAGNÓSTICO					
	0	1	2	3	4	5
I	100	91.4	87	82.6	78.2	74
IIA	100	89.9	83.4	77.8	72	66.5
IIB	100	85.4	77.8	69.1	62.9	58.6
IIC	100	66	52.5	45.3	41.5	37.3
IIIA	100	98.3	88	83.6	79.1	73.1
IIIB	100	83.4	70.8	59.3	51.7	46.3
IIIC	100	71.9	50.3	39	32.9	28
IV	100	39.9	19.7	11.3	7.6	5.7

3.2.1.1. Tumor primario

A diferencia de lo que ocurre en otros tumores, clásicamente se ha considerado que el tamaño y la configuración macroscópica del tumor no tienen un impacto pronóstico significativo en CCR. Sin embargo, datos recientes sugieren que un tamaño tumoral superior a 4.5 cm puede ser un factor pronóstico adverso independiente²⁰⁶.

La profundidad de la invasión de la pared colónica es un factor que influye negativamente en la supervivencia^{15,16}. Sin embargo, la determinación de la afectación serosa o peritoneal local (estadios T4a) puede ser complicada, ya que los hallazgos histopatológicos son heterogéneos y no hay guías de consenso para la interpretación de los mismos²⁰⁷. La afectación del peritoneo puede venir determinada por una inflamación mesotelial y/o reacción hiperplásica con tumor próximo a la superficie serosa, tumor en la superficie serosa acompañado de reacción inflamatoria o hiperplásica y/o erosión o ulceración subyacente o células tumorales libres en la superficie peritoneal. Las tres situaciones implican un pronóstico adverso^{16,207}, pero la presencia de células tumorales libres tiene mayor capacidad de predecir la recurrencia y/o persistencia intraperitoneal del tumor que los otros dos casos¹⁶.

3.2.1.2. Afectación ganglionar

El número de ganglios linfáticos regionales afectados es el segundo factor pronóstico adverso más importante tras las metástasis a distancia^{84,86} y su incidencia guarda relación con la profundidad de la invasión transmural del tumor y el grado histológico.

Además de los ganglios afectados, varios estudios han evaluado el valor pronóstico del número total de ganglios linfáticos analizados en la pieza quirúrgica, objetivando una asociación significativa entre el examen de ≥ 12 ganglios y la mejora de la supervivencia tanto en los tumores estadios II como en los estadio III^{28,208-211}. El valor pronóstico del ratio de afectación ganglionar (RAG), definido como el cociente entre los ganglios positivos y los ganglios examinados, también se ha confirmado recientemente, demostrándose que un RAG elevado se asocia de forma independiente con una supervivencia desfavorable^{17,212-214} y que la capacidad de este parámetro para establecer grupos pronósticos es superior a la del número de ganglios afectados^{212,215}.

En cuanto a los nódulos satélites, definidos en la clasificación TNM 2010⁸⁴ como depósitos tumorales extranodales en la grasa pericólica o el mesenterio adyacente, se consideran equivalentes a las metástasis ganglionares, incluso en ausencia de

arquitectura nodal. Su presencia se considera un factor pronóstico adverso²¹⁶⁻²¹⁹, capaz de equiparar el pronóstico de la enfermedad N0 al del estadio III²¹⁶.

Finalmente, en los últimos años existe un interés creciente en el significado pronóstico de las micrometástasis ganglionares, definidas como células tumorales aisladas o agrupaciones celulares ≤ 0.2 mm en su dimensión mayor detectadas mediante tinciones con hematoxilina/eosina o métodos inmunohistoquímicos, o cualquier evidencia de tumor detectada únicamente mediante métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa reversa (RT-PCR)²²⁰. Aunque las técnicas moleculares pueden detectar células tumorales ocultas hasta en el 25-50% de los pacientes con ganglios negativos en el análisis histopatológico rutinario, su significado biológico no está aclarado debido a los resultados inconsistentes de los trabajos iniciales^{221,222}. Sin embargo, un estudio reciente de 312 pacientes con estadio pN0 observó que el 81% las recaídas se produjeron en los casos en los se identificaban células tumorales aisladas por inmunohistoquímica²²³. Un meta-análisis de 39 estudios también ha confirmado el valor pronóstico adverso de la carga tumoral oculta en los ganglios linfáticos de tumores pN0 evaluada mediante RT-PCR, con independencia del número de ganglios examinados¹⁹. Aunque estos resultados son prometedores, se necesitan estudios prospectivos confirmatorios antes de poder utilizarse para individualizar la indicación de QT adyuvante en pacientes con ganglios negativos²⁰.

3.2.2. Localización tumoral

Existen diferencias importantes en las características clínicas, patológicas y biológicas del CC en función de su localización. Así, las neoplasias de colon derecho son con frecuencia exofíticas, diploides, con histología mucinosa, IMS-H y mutaciones en BRAF, mientras que las de colon izquierdo suelen ser lesiones infiltrantes, con inestabilidad cromosómica y frecuentemente aneuploides²²⁴⁻²²⁶. Sin embargo, no está claro si estas diferencias impactan en la supervivencia de los pacientes, ya que los resultados de los estudios que han evaluado el valor pronóstico de la localización tumoral no son concluyentes²²⁷⁻²²⁹. Además, varios trabajos han demostrado que la relación entre la localización tumoral y la supervivencia puede variar en función del estadio tumoral²²⁷⁻²³¹, lo que probablemente pueda explicarse por las diferencias biológicas entre estadios, particularmente en relación al estatus de IMS. Así, la IMS-H aparece fundamentalmente en los tumores de colon derecho²²⁵ y en menos del 5% de los de colon izquierdo²²³, se asocia con una reducción del riesgo de afectación ganglionar y metástasis a distancia^{229,232,233} y confiere un pronóstico favorable^{30,234,235}.

Introducción

3.2.3. Calidad de la cirugía

La calidad de la cirugía impacta de forma decisiva en el pronóstico del CCR^{88,236}. Han de considerarse los aspectos que se describen a continuación:

3.2.3.1.- Márgenes de resección

En el CC las recidivas locales son excepcionales cuando los márgenes proximal y distal son mayores de 5 centímetros. En cuanto al margen de resección circunferencial, varios autores han trasladado el concepto de excisión total del mesorecto de cáncer de recto a la cirugía del CC, demostrando que la excisión completa del mesocolon, definida como la separación de éste del plano parietal y la ligadura de las arterias y venas de drenaje en su origen, reduce las tasas de recidiva local y mejora la SG^{88,236-238}.

3.2.3.2.- Tumor residual

La presencia de tumor residual tras la cirugía es un factor pronóstico adverso ampliamente validado^{239,240}, que depende tanto del estatus de los márgenes quirúrgicos como de cualquier evidencia de tumor no resecado. La designación R indica la presencia de tumor residual local tras un tratamiento potencialmente curativo y es un término apropiado sólo en caso de enfermedad M0. La Tabla 8 resume las tres categorías de enfermedad residual (R0, R1 y R2) de la clasificación TNM 2010⁸⁴.

Tabla 8: Categorías de enfermedad residual en la clasificación TNM 2010

CATEGORÍA	DEFINICIÓN
R0	Resección tumoral completa, sin tumor residual en ninguno de los márgenes
R1	Resección tumoral incompleta con tumor residual microscópico en los márgenes quirúrgicos (márgenes microscópicamente afectados)
R2	Resección tumoral incompleta con enfermedad residual macroscópica (tumor primario, ganglios regionales o afectación macroscópica de márgenes quirúrgicos)

3.2.3.3.- Regresión tumoral tras tratamiento neoadyuvante

Aunque el grado de regresión tumoral tras el tratamiento preoperatorio es un factor pronóstico confirmado en cáncer rectal^{241,242}, su importancia en CC es limitada. En la

actualidad no existen datos suficientemente validados que permitan definir grupos pronósticos e individualizar el tratamiento adyuvante en base a este parámetro.

3.2.4. Características histopatológicas de la célula tumoral

3.2.4.1.- Tipo histológico

La gran mayoría de los CCR son adenocarcinomas. Como regla general, la histología no es un factor pronóstico independiente demostrado, con la excepción de algunos subtipos poco frecuentes, como el carcinoma de células en anillo de sello^{156,243-245}, el adenoescamoso^{246,247}, el de células pequeñas y el indiferenciado^{248,249}, estirpes de mal pronóstico, y el carcinoma medular²⁵⁰, que presenta un pronóstico favorable (Tabla 9).

Tabla 9: Clasificación histológica de CCR de la Organización Mundial de la Salud

1. Adenocarcinoma in situ/displasia severa
2. Adenocarcinoma
3. Adenocarcinoma mucinoso (coloide) (>50% mucinoso)
4. Adenocarcinoma de células en anillo de sello (>50% de células en anillo de sello)
5. Carcinoma de células escamosas (epidermoide)
6. Carcinoma adenoescamoso
7. Carcinoma de células pequeñas (oat cell)
8. Carcinoma medular
9. Carcinoma indiferenciado
10. Otros (por ejemplo, carcinoma papilar)

Los tumores mucinosos representan el 11-17% de los CCR^{144,251-256}, son más frecuentes en pacientes jóvenes y se localizan fundamentalmente en el colon derecho. Aunque algunos estudios sugieren una peor respuesta a la QT^{249,253,255}, este hecho es controvertido²⁵⁶ y el impacto pronóstico de la histología mucinosa puede verse modulado por la localización tumoral y el estatus de IMS^{256,257}.

Aproximadamente el 10% de los CCR, particularmente los tumores pobremente diferenciados, contienen focos de diferenciación neuroendocrina. Aquellos con un componente neuroendocrino extenso se clasifican como carcinomas de célula pequeña y presentan un pronóstico desfavorable²⁴⁸. Sin embargo, el valor pronóstico de la diferenciación neuroendocrina focal es controvertido^{248,249,258}.

Introducción

Recientemente la Organización Mundial de la Salud ha reconocido un nuevo subtipo histológico, el carcinoma medular. Se trata de una neoplasia poco frecuente, no constituida por estructuras glandulares, sino por células con un patrón de crecimiento sólido. La importancia de reconocer esta histología radica en su frecuente asociación con la MSI-H, con el síndrome de Lynch y con un pronóstico más favorable²⁵⁰.

3.2.4.2.- Grado histológico

Refleja el grado de diferenciación tumoral y ha demostrado ser un factor pronóstico consolidado independiente del estadio tumoral^{27,259}. Sin embargo, se trata de un parámetro subjetivo, con importante variabilidad interobservador y para el que no existen criterios de gradación uniformemente aceptados²⁶⁰. En la mayoría de los estudios el valor pronóstico del grado histológico adquiere significación estadística cuando se consideran dos categorías: bajo grado (tumores bien y moderadamente diferenciados) versus alto grado (tumores pobremente diferenciados e indiferenciados). Por ello, la AJCC/UICC⁸⁴ recomienda adoptar un sistema de gradación con dos variables con puntos de corte bien definidos, así como asignar el grado en función de la presencia de formaciones glandulares exclusivamente. Los tumores de bajo grado presentan $\geq 50\%$ formaciones glandulares, mientras que aquellos de alto grado no forman estructuras glandulares bien definidas sino cordones celulares mal delimitados, con atipia celular marcada y alto índice mitótico.

3.2.4.3.- Actividad proliferativa

El valor pronóstico de los marcadores proliferación, particularmente en los estadios iniciales, no está bien definido, ya que, aunque algunos estudios han demostrado una asociación entre una actividad proliferativa elevada y una supervivencia inferior^{261,262-264}, otros trabajos no han confirmado estos resultados^{146,265,266}.

3.2.5. Parámetros de invasión local

3.2.5.1.- Invasión vascular, linfática y perineural

Varios estudios han demostrado que la invasión vascular^{21,267-272}, fundamentalmente de las venas extramurales, y la invasión linfática^{21,267,268,272,273} son factores pronóstico independientes, asociados con mayor riesgo de diseminación ganglionar²⁷³ y metástasis a distancia^{270,271}. La invasión perineural está presente en el 9-30% de los tumores, aumentando su incidencia con el grado histológico y el estadio^{22,23,268,274-277}.

En la mayoría de los trabajos recientes se identifica como un factor pronóstico adverso^{22,23,268,275-277}, con independencia de otras características de mal pronóstico.

3.2.5.2.- Patrón de crecimiento tumoral (“frente tumoral”)

El tumor en el frente invasivo puede adoptar un patrón de crecimiento infiltrativo, cuando penetra de forma difusa en el tejido sano adyacente, o expansivo, cuando el límite tumor-estroma está bien circunscrito²⁷⁸⁻²⁸⁰. La configuración infiltrativa, presente en el 17-80% de los CC, ha demostrado ser un factor pronóstico adverso independiente^{279,281}, lo que podría explicarse por reflejar una menor respuesta inflamatoria del huésped frente al tumor^{278,282-284} y por su frecuente asociación con características moleculares relacionadas con un comportamiento tumoral agresivo, como la mutación BRAFV600 o la ausencia de IMS-H^{279,281,285}. Otros trabajos también han encontrado asociación entre la presencia de células tumorales indiferenciadas aisladas o agrupadas en pequeños focos en la inmediata vecindad del frente invasivo, lo que se ha denominado “brote tumoral” o “desdiferenciación focal” (*tumour budding*)²⁸⁶, y una supervivencia desfavorable²⁸⁶⁻²⁹².

3.2.5.3.- Fibrosis peritumoral y respuesta inflamatoria

La respuesta desmoplásica del estroma es una característica común del CCR invasivo y un factor pronóstico adverso en algunos^{16,293}, aunque no en todos²⁹⁴, los estudios. Por otra parte, la infiltración linfoide intratumoral constituye un factor pronóstico favorable en la mayoría de los trabajos^{284,295-300}. En concreto, la presencia de una densidad alta de células T CD8+ y CD45RO+ se ha asociado con una mejoría de la supervivencia^{284,297,298}. Más recientemente, se ha demostrado que la alta densidad de linfocitos T reguladores posee un valor pronóstico independiente más potente que el de las células CD8+ y CD45RO+^{301,302}. Estos datos sugieren que la respuesta inflamatoria reflejaría que los mecanismos de defensa del huésped están operativos⁴¹⁰, aunque no existen datos directos que confirmen esta hipótesis. También se ha sugerido que la infiltración linfoide puede representar un marcador pronóstico favorable debido a su asociación con la IMS-H^{282,303,304}, aunque algunos estudios han demostrado que el valor pronóstico de ambos es independiente^{282,304}. Aunque estos datos son prometedores, son necesarios estudios prospectivos con suficiente potencia estadística y criterios uniformes de evaluación patológica de las muestras para definir definitivamente la importancia pronóstica de este parámetro.

4. MARCADORES MOLECULARES CON VALOR PRONÓSTICO Y PREDICTIVO DE RESPUESTA Y TOXICIDAD EN ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER COLORRECTAL

Los avances en el conocimiento de los genes y vías de señalización relevantes para la iniciación y progresión del CCR han permitido en los últimos años la caracterización molecular de esta neoplasia³⁰⁵⁻³⁰⁸, así como la identificación de marcadores moleculares potencialmente útiles en el tratamiento de los pacientes. Entre los que se han estudiado en mayor medida en los estadios iniciales se encuentran la IMS^{30-32,234,257,307-310}, la delección de 18q (18qLOH)^{33,311-313}, las mutaciones en K-ras^{32,307,308,314-317}, BRAF^{33,307,308,314,318}, PIK3CA^{319,320}, las alteraciones moleculares en los genes implicados en el ciclo celular^{34,321,322}, la expresión y/o los polimorfismos genéticos de las enzimas implicadas en el metabolismo de los agentes quimioterápicos³⁶⁻⁴⁸, los perfiles de expresión génica o basados en microRNA^{35,323-326} o la presencia de células tumorales circulantes mediante métodos moleculares³²⁷⁻³³⁰.

A pesar de los datos prometedores iniciales que relacionan estos marcadores moleculares con el pronóstico y la definición de grupos con alto riesgo de recidiva^{30,33,42,234,314,323}, no se ha identificado hasta la fecha un marcador o un perfil molecular con capacidad predictiva que permita identificar los casos con mayor probabilidad de beneficiarse de la QT adyuvante³³¹. Existe, no obstante, una excepción: la presencia de IMS parece asociarse con una resistencia relativa a las fluoropirimidinas^{30,31,234,257}, como veremos a continuación.

La revisión en profundidad de estos marcadores moleculares escapa de los objetivos de la introducción de esta tesis, por lo que nos centraremos en los más relevantes, fundamentalmente en los SNPs en genes relacionados con el metabolismo del oxaliplatino y las fluoropirimidias y otras vías oncogénicas relevantes, por ser el propósito de este trabajo.

4.1. IMS

4.1.1. Significado clínico y métodos de estudio

Los microsatélites son secuencias de ADN en las que un fragmento de longitud entre 2 y 6 pares de bases se repite de manera consecutiva. Se localizan a lo largo de todo el genoma, más comúnmente en las regiones no codificantes, pero también en regiones promotoras y en las propias regiones codificantes. Teniendo en cuenta su estructura

en secuencias repetitivas, presentan una tasa de mutaciones particularmente elevada. Durante la replicación del genoma las ADN polimerasas cometen errores en la correcta duplicación de los microsatélites que habitualmente se corrigen por el sistema de reparación de los errores de apareamiento de bases (mismatch repair, MMR). La característica molecular de los tumores con IMS es la deficiencia de este sistema de reparación, lo que conlleva la presencia de inserciones o deleciones de nucleótidos que altera la longitud de los respectivos microsatélites^{303,332-336}, y a su vez introduce mutaciones secundarias en genes relevantes en la tumorigénesis del CCR^{337,338}.

Las deficiencias en el sistema MMR se explican por dos mecanismos diferentes. El primero de ellos es la presencia de mutaciones en línea germinal en uno de los genes del sistema MMR (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 o TACSTD1/EPCAM), lo que caracteriza al síndrome de Lynch³³⁹. El segundo mecanismo, responsable del 15-20% de los CCR esporádicos, consiste en la inactivación somática de los dos alelos de estos genes, debido fundamentalmente al silenciamiento epigenético del gen MLH1 por hipermetilación de las islas CpG en su región promotora^{340,341}.

La evaluación de la IMS se lleva a cabo mediante dos aproximaciones: el estudio inmunohistoquímico de las proteínas del sistema MMR o bien el análisis por PCR de un panel de marcadores de microsatélites en el tumor y en la mucosa normal³⁴²⁻³⁴⁴. La conferencia de consenso de Bethesda propuso como estándar un panel de cinco marcadores (D2S123, D5S346, D17S250, BAT26, BAT25)³⁴³, pero existen otras opciones que incorporan un número superior³⁴⁴. En base a estos criterios, se definen los tumores con IMS-H como aquellos con ausencia de expresión de algunas de las proteínas del sistema MMR (MMR deficiente, dMMR) o con diferencias en la longitud de al menos dos de los marcadores del panel de Bethesda (o de más del 30% de los marcadores en los paneles que incluyen más de cinco). La inestabilidad en un marcador o en menos del 30% define a los tumores con baja IMS (IMS-L) y la ausencia de IMS en todos los marcadores a los tumores estables (MSS)³⁴⁵.

Los CCR con MSI-H presentan una serie de características moleculares que los diferencian de aquellos originados a partir de la vía de la inestabilidad cromosómica, como la baja frecuencia de mutaciones en KRAS y la alta tasa de mutaciones en otros componentes de la vía PI3K/AKT/mTOR (PIK3CA, PTEN)^{346,347}. La mutación somática V600E en BRAF se encuentra hasta en el 70% de los tumores IMS-H esporádicos causados por la inactivación epigenética de MLH1, pero prácticamente nunca está presente en el síndrome de Lynch³⁴⁸⁻³⁵⁰. Además, tienen un fenotipo clínico-patológico específico^{351,352}. Son más frecuentes en mujeres y los casos esporádicos se suelen

presentar a una edad más avanzada que los tumores MSS³⁵³, se localizan preferentemente en el colon derecho y se suelen diagnosticar en estadios más precoces (aproximadamente el 20% de los CCR estadio II presentan MSI-H versus el 12% de los estadios III⁴²⁵ y el 3.5% de los estadios IV³⁵⁴). Suelen ser tumores pobremente diferenciados, con histología mucinosa, medular o de células en anillo de sello, presencia de infiltración linfocítica intra y tipo Crohn-like y ADN diploide^{30,234,340}.

4.1.2. IMS como factor pronóstico y predictivo de respuesta a la QT adyuvante

El valor pronóstico de la IMS en estadios iniciales ha sido ampliamente revisado a partir de los datos de pacientes incluidos en ensayos fase III de QT adyuvante^{31,32,233,234,257,307-309,355-365} y en varios metanálisis^{30,310,356,366}. La mayoría de los trabajos concluyen que los tumores con IMS-H presentan una menor tasa de recidivas, fundamentalmente a distancia²⁵⁷, y un mejor pronóstico que aquellos con MSS, aunque el efecto es más evidente en los estadios II que en los III³⁶¹.

En cuanto al papel de la IMS como marcador predictivo de respuesta a la QT adyuvante, la mayoría de los estudios^{30,31,234,304,310,356,365}, aunque no todos^{32,355,464}, demuestran que el tratamiento adyuvante con 5-FU mejora significativamente la supervivencia de los pacientes con CCR estadio II-III e IMS-L o MSS respecto al tratamiento quirúrgico exclusivo, sin impactar en el pronóstico de aquellos con IMS-H. Dos grandes estudios en los que se han analizado los datos de varios ensayos randomizados han confirmado que el efecto deletéreo de la QT basada en 5-FU en tumores con IMS-H se restringe a pacientes con estadio II³¹, pero no es aplicable a los estadios III²⁵⁷. Además, un subanálisis del estudio de Sinicrope demuestra que la adyuvancia con 5-FU en CC estadio III IMS-H mejora el pronóstico de los pacientes portadores de mutaciones germinales en los genes del sistema MMR, pero no beneficia a aquellos con tumores esporádicos ($p=0.006$)²⁵⁷, lo cual sugiere la existencia de diferencias moleculares en los tumores MSI-H que podrían condicionar diferentes respuestas a fluoropirimidinas. Se han propuesto varias hipótesis para explicar los mecanismos biológicos por los que el tratamiento con 5-FU no beneficia a los pacientes con alteraciones en el sistema MMR. Una posibilidad sería la supresión de la respuesta inmune antitumoral mediada por la infiltración linfocítica característica de estos tumores como consecuencia del efecto inmunosupresor de la QT³⁶⁷. Otra hipótesis considera la necesidad de un sistema MMR competente para inducir apoptosis en las células tumorales con su ADN modificado por el efecto del 5-FU^{368,369}.

Respecto al papel del oxaliplatino, no hay estudios prospectivos que hayan evaluado el beneficio de la adyuvancia con este fármaco en pacientes con IMS-H. Sin embargo, la mayoría de los análisis retrospectivos realizados sugieren que el oxaliplatino adyuvante proporcionaría un beneficio independiente del estatus MMR, fundamentalmente en los estadios III y en los tumores proximales^{355,357-359,370,371}. Finalmente, datos preclínicos y clínicos recientes sugieren que los tumores con IMS-H podrían tener una mayor sensibilidad a irinotecán, lo que se explicaría por la deficiencia en los mecanismos de reparación implicados en las roturas de doble cadena inducidas por el fármaco^{372,373}. Así, un subanálisis del estudio CALGB 89803, en el que se evaluó el beneficio de añadir irinotecán a 5-FU bolus/LV en pacientes con CCR estadio III, ha demostrado una tendencia hacia una SLE favorable en los enfermos con MSI-H tratados con la combinación (HR=0.52; p=0.07)³⁶³. Sin embargo, el estudio PETACC-3 no ha confirmado estos resultados en pacientes con estadios II y III, ya que la adición de irinotecán al 5-FU infusión continua/LV no mejoró el pronóstico de los pacientes con IMS-H respecto a los tumores MSS³⁶¹. Los datos contradictorios de estos dos estudios pueden explicarse por las diferencias en la inclusión de pacientes con estadio II y en la definición de tumores con IMS-H.

En base a los resultados descritos, parecer razonable testar el estatus MMR en los pacientes con CCR estadio II en los que se considera la administración de QT adyuvante con 5-FU, así como obviar dicho tratamiento en los tumores IMS-H y riesgo estándar de recidiva, teniendo en cuenta su pronóstico favorable y la ausencia de beneficio con la terapia adyuvante. La decisión en los estadios II de alto riesgo debe individualizarse en función de los riesgos y preferencias del paciente. El manejo óptimo de los estadios III con dMMR es más complejo ya que múltiples estudios han demostrado el beneficio de la adyuvancia con 5-FU^{105,106,109,111-119}, y en la actualidad no debe considerarse la IMS como un marcador validado para establecer las decisiones terapéuticas en esta población.

Los principales estudios que han analizado el valor pronóstico y predictivo de respuesta de la IMS en pacientes tratados con CT adyuvante basada en 5-FU y en oxaliplatino e irinotecán se resumen en las Tablas 10 y 11, respectivamente.

Introducción

Tabla 10: Estudios que analizan el valor pronóstico/predictivo de la IMS en pacientes tratados con QT adyuvante basada en 5-FU

REFERENCIA	TIPO DE ESTUDIO POBLACIÓN	MARCADOR PRONÓSTICO	MARCADOR PREDICTIVO
Ribic et al²³⁴ (2003)	Retrospectivo de ECR N=570 (16.7% IMS-H) Estadios II-III	Mejor pronóstico en pacientes con MSI-H no tratados con QT (HR SG=0.31; p=0.004)	La CT mejora la SG de los pacientes con MSI-L/MSS (HR=0.72; p=0.04), no de aquellos con MSI-H (HR=2.14; p=0.11)
Jover et al³²⁸ (2009)	Cohorte prospectiva N=505 (10.1% dMMR) Estadios II-III	No diferencias en SLE (p=0.3) ni SG (p=0.3) en función del estatus MMR	La CT mejora la SG de los pacientes con cMMR (p=0.00001), no de aquellos con dMMR (p=0.7)
Sargent et al³¹ (2010)	Retrospectivo de ECR N=457 (15% dMMR) Estadios II-III	Mejor pronóstico en pacientes no tratados con QT con MSI-H (HR SLE=0.51; p=0.06)	La CT mejora la SLE de los pacientes con cMMR (HR=0.67; p=0.02), no de aquellos con dMMR (HR=1.10; p=0.85)
Hutchins et al³² (2011)	Análisis retrospectivo del estudio QUASAR N=1913 (11.5% dMMR) Estadio II	Menor riesgo de recaída en tumores dMMR (HR=0.53; p<0.001)	El beneficio de la QT respecto a la cirugía exclusiva es independiente del estatus MMR
Sinicrope et al³⁵⁸ (2011)	Retrospectivo de ECR N=2141 (16.1% dMMR) Estadios II-III	Mejor SLE (p=0.035) y SG (p=0.031) en los pacientes con dMMR no tratados con QT	Beneficio en SLE en estadios III tratados con QT con independencia del estatus MMR. Mejoría en SLE con QT en tumores dMMR con mutaciones germinales, no en los esporádicos (p=0.006)
Merok et al³⁰⁹ (2013)	Retrospectivo N=613 (14% MSI-H) Estadios I-IV	Mejor SLE (p=0.045) y SG (p=0.112) en los pacientes con MSI-H	No disponible
Popat et al³⁰ (2005)	Meta-análisis 32 estudios N=7642 (16.7% MSI-H) Estadios II-III	Mejor SG en pacientes con IMS-H no tratados con QT (HR=0.65; p<0.05)	La QT mejora la SG de los pacientes con IMS-L/MSS (HR=0.72; p=0.007), pero no la de aquellos IMS-H
Des Guetz et al³⁵⁶ (2009)	Meta-análisis 7 estudios N=3690 (14% MSI-H) Estadios II-III	No disponible	La QT mejora la SLE de los pacientes MSS, sin impacto en aquellos con IMS-H (p<0.001)
Guastadisegni et al³⁶⁶ (2009)	Meta-análisis 31 estudios N=12782 (7-32% MSI-H) Estadios I-IV	Mejor SLE (HR=0.58; p<0.0001) y SG (HR=0.6; p<0.0001) en pacientes con IMS-H no tratados con QT	La QT mejora el pronóstico en pacientes con MSS (HR=0.52; p<0.0001). Datos en pacientes con IMS-H no concluyentes
Sargent et al³¹⁰ (2014)	Meta-análisis 26 ECR (datos MMR de 17 ECR) N=7803 (17.71% MSI-H) Estadios II-III	El estatus dMMR se asocia con mejor SG en estadios II tratados sólo con cirugía (p=0.01) y en estadios III tratados con QT (p=0.039)	No disponible

ECR: Ensayo clínico randomizado

Tabla 11: Estudios que analizan el valor pronóstico/predictivo de la IMS en pacientes tratados con QT adyuvante basada en oxaliplatino e irinotecán

REFERENCIA	POBLACIÓN TIPO DE ESTUDIO	MARCADOR PRONÓSTICO	MARCADOR PREDICTIVO
Zaanan et al³⁵⁷ (2011)	Análisis retrospectivo N=303 (11.2% dMMR) Estadio III tratados con FOLFOX	Mejor SLE en pacientes con tumores dMMR que en aquellos con cMMR (HR=2.16; p=0.027)	No disponible
Gavin et al³⁵⁵ (2009)	Análisis retrospectivo de estudios NSABP C-07 y C-08 N=2299 (11.5% dMMR) Estadios II y III	Los pacientes con tumores dMMR presentaban una tasa de recidivas inferior que los cMMR (HR=0.48; p<0.00001)	El estatus MMR no es factor predictivo de beneficio a oxaliplatino (p=0.971)
Sinicrope et al³⁵⁸ (2013)	Análisis retrospectivo estudio NCCTG N0147 N=2686 (12% dMMR) Estadio III tratados con FOLFOX+/-cetuximab	Globalmente, el estatus MMR no es factor pronóstico (p=0.14). En tumores proximales, la SLE es mejor en tumores dMMR que cMMR (HR=0.71; p=0.018)	No disponible
Flejou et al³⁶⁹ (2013)	Análisis retrospectivo estudio MOSAIC N=986 (9.13% dMMR) Estadios II-II	No disponible	Los estadio III dMMR presentan un beneficio no significativo con la adición de oxaliplatino a 5-FU/LV (p<0.05)
Toujeron et al³⁷⁰ (2014)	Análisis retrospectivo N=433 con MSI-H Estadios II-II tratados con cirugía +/- QT (5-FU o FOLFOX)	No disponible	La QT con FOLFOX mejora la SLE respecto a la cirugía/5-FU en los estadios III (p=0.0014) y en los II (p=0.0549)
Tejpar et al³⁶¹ (2009)	Análisis retrospectivo estudio PETACC-3 N=3278 (15.15% MSI-H) Estadios II-III	Mejor SLE (p=0.0008)/ SG (p=0.0003) en pacientes MSI-H, con impacto superior en el estadio II	No beneficio de añadir irinotecán a 5-FU/LV ni en pacientes MSI-H ni en MSI-L/MSS
Bertagnolli et al³⁰ (2009)	Análisis prospectivo estudio CALGB 89803 N=723 (13.3% MSI-H) Estadios III	Mejor SLE en pacientes tratados con irinotecán con MSI-H respecto a MSS (HR=0.76; p=0.03). No diferencias en el grupo tratado con 5-FU/LV	Mejor SLE en pacientes con IMS-H tratados con irinotecán respecto 5-FU/LV (HR=0.57; p=0.07)

4.2. VÍA DE SEÑALIZACIÓN RAS/RAF/MAPK

4.2.1. Mutaciones en KRAS

KRAS, uno de los proto-oncogenes más importantes en la carcinogénesis del CCR, pertenece a la familia de oncogenes RAS y codifica la proteína RAS, que actúa regulando la señalización intracelular a través de la vía RAS/RAF/MAPK³⁷⁴. Las

mutaciones activadoras de KRAS, presentes en el 35-45% de los CCR esporádicos³⁷⁵, constituyen un evento precoz en la tumorigénesis³⁷⁶ y la mayoría de los estudios demuestran una concordancia $\geq 95\%$ entre el estatus mutacional del tumor primario y sus metástasis³⁷⁷. Hasta el 90% de las mutaciones se detectan en los codones 12 (82-87%) y 13 (13-18%), y con menor frecuencia en los codones 61, 63 y 146. Los tumores con mutaciones en KRAS se localizan más frecuentemente en colon derecho y son menos propensos a tener MSI-H o histología pobremente diferenciada³⁷⁸.

Los datos acerca del valor pronóstico de las mutaciones de KRAS en los estadios II-III son controvertidos. Dos meta-análisis del grupo RASCAL demostraron que su presencia en estadios iniciales es un factor pronóstico adverso³⁷⁶, siendo el impacto más evidente en el caso de la mutación p.Gly12Val y en los estadios III³⁷⁹. Posteriormente, el estudio QUASAR³² y varios estudios recientes de pacientes tratados con esquema FOLFOX+/-cetuximab^{316,317,380} también objetivaron una supervivencia inferior en presencia de mutaciones en este gen. Sin embargo, otros grandes estudios de adyuvancia, entre los que se incluyen el CALGB 89803³¹⁵ y el PETACC-3³¹⁴, no han podido confirmar estos datos al no encontrar diferencias en supervivencia en pacientes con estadio II-III en función del estatus KRAS. Por otra parte, aunque las mutaciones en KRAS son un predictor establecido de ausencia de respuesta a las terapias anti-EGFR en los estadios avanzados³⁷⁵, la mayoría de los estudios en el contexto adyuvante no han encontrado asociación entre el estatus de KRAS y el beneficio de la QT adyuvante basada en 5-FU^{315,321,381}.

Finalmente, los resultados de algunos trabajos sugieren que la presencia de mutaciones de KRAS en plasma^{382,383} o en ganglios linfáticos histológicamente negativos de los CCR estadio II^{19,384} se asocian con un mayor riesgo de recidiva en pacientes operados, por lo que podría ser de utilidad en la identificación de pacientes candidatos a recibir tratamiento adyuvante. Sin embargo, son necesarios estudios prospectivos de mayor tamaño que validen estos datos.

4.2.2. Mutaciones en BRAF

El gen BRAF codifica una serin-treonina quinasa que pertenece a la vía de señalización RAS-RAF-MAP2K(MEK)-MAPK³⁸⁵. Las mutaciones activadoras en BRAF, mutuamente excluyentes con las de KRAS, se encuentran presentes en aproximadamente el 10-20% de los CCR y en el 34-70% de los tumores esporádicos con IMS-H^{314,386,387}, como se ha comentado previamente. La mutación V600E es la más frecuente (>95%) y la que mayor implicación funcional tiene en la activación

aberrante de la vía MEK-ERK y la carcinogénesis del CCR³⁸⁸. Un meta-análisis recientemente publicado concluye que las mutaciones V600E en BRAF se asocian con el sexo femenino, la edad avanzada, la localización en colon derecho, la IMS, la metilación de MLH1 y características patológicas de mal pronóstico, como la histología mucinosa y pobremente diferenciada o un estadio TNM más avanzado³⁷⁸.

Al igual que ocurre en la enfermedad avanzada^{387,389}, en los estadios iniciales las mutaciones de BRAF se asocian a un pronóstico desfavorable en la mayoría^{314,318,355,390-394}, aunque no en todos^{32,380,395,396} los estudios realizados. Además, varios trabajos han sugerido que el impacto pronóstico de las mutaciones de BRAF puede variar en función del estatus de IMS, constituyendo dichas mutaciones un claro factor pronóstico adverso en los CCR con MSS, pero modificando en menor medida el pronóstico favorable que presentan los tumores con IMS-H^{32,314,318,355,361,396,397}. Así, en los estudios PETACC-3³¹⁴ y CALGB 89803³¹⁸ el impacto pronóstico negativo de las mutaciones en BRAF sólo pudo confirmarse en la población con MSS y en un análisis combinado de 2299 pacientes incluidos en dos estudios de adyuvancia del grupo NSABP, las mutaciones en BRAF se asociaron con un mal pronóstico global, evidenciándose también una interacción significativa con el estatus MMR³⁵⁵.

De forma similar a lo que ocurre con las mutaciones en KRAS, hasta la fecha son pocos los estudios que han evaluado su valor de las mutaciones en BRAF en relación con la eficacia de los esquemas de QT utilizados en adyuvancia^{32,314,318}. En los estudios QUASAR³² y PETACC-3³¹⁴ el estatus mutacional de BRAF no predice el beneficio del tratamiento con 5-FU, mientras que en el estudio CALGB 89803³¹⁸, se evidenció una SG favorable con el esquema IFL respecto a 5-FU/LV en los tumores BRAF wild type (WT), sin encontrarse diferencias significativas en los BRAF mutados.

Finalmente, Popovici et al. han conseguido identificar una firma de 64 genes con capacidad para predecir la presencia de mutaciones en BRAF a partir de 668 muestras de pacientes incluidos en el estudio PETACC-3³⁹⁸. Además, este perfil de expresión génica es compartido por una subpoblación de pacientes BRAF WT (30% con mutaciones en KRAS, 13% doble WT) que presentan características clínico-patológicas y un pronóstico desfavorable similar que los pacientes BRAF mutados. Estos hallazgos sugieren una biología común entre los dos grupos descritos y proporcionan una nueva herramienta de clasificación que tiene en cuenta información biológica que no refleja el conocimiento del estatus mutacional de un único gen.

4.3. PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA Y DE microRNAs

Se han identificado numerosos perfiles de expresión génica^{35,188,323-325,399-419} que permiten clasificar a los pacientes con CCR estadios II-III en función del riesgo de recidiva. Los perfiles iniciales presentaban problemas metodológicos importantes como el tamaño muestral limitado, la ausencia de estudios prospectivos diseñados para evaluar su valor pronóstico y de una validación satisfactoria³⁹⁹⁻⁴⁰⁶. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado mediante arrays de expresión o PCR cuantitativa varias plataformas en grandes cohortes de pacientes cuyo valor pronóstico se ha confirmado en series independientes. Entre ellas se encuentran Oncotype Dx Colon Cancer (Genomic Health, Inc)^{323,415-417}, ColonPRS (Signal Genetics LLC)⁴¹², ColoPrint (Agendia NV)^{35,418-420}, Gene Fx Colon (Precision Therapeutics Inc.)⁴¹³, OncoDefender-CRC (Everist Genomics, Inc)⁴¹⁴, ColoGuideEx³²⁴, ColoGuidePro³²⁵ y ColoLipidGene⁴⁰⁷.

La mayoría de estos perfiles se han centrado en el CCR estadio II. GeneFxColon⁴¹³, OncoDefender-CRC⁴¹⁴, ColoGuideEx³²⁴ y ColoLipid Gene⁴⁰⁷ se desarrollaron específicamente para identificar pacientes con estadio II y alto riesgo de recidiva. Aunque Oncotype Dx Colon Cancer se desarrolló también para pacientes con estadio III³²³, los análisis de validación se han restringido a los estadios II⁴¹⁵⁻⁴¹⁷. De forma similar, el objetivo primario del estudio Prospective Analysis of Risk Stratification by ColoPrint (PARSC)⁴²⁰, el primer trabajo prospectivo observacional específicamente diseñado para evaluar el valor pronóstico de un perfil de expresión génica en CC, ha sido validar los resultados de ColoPrint en pacientes con estadio II. En la mayoría de estos estudios se ha demostrado de forma retrospectiva el valor pronóstico de las firmas génicas, independiente de los factores clínico-patológicos considerados de alto riesgo en CCR estadio II. Además, los estudios Oncotype Dx Colon Cancer y ColoPrint también han confirmado que sus resultados son independientes del estatus MMR. Respecto a los estadios III, la aplicabilidad clínica de las firmas génicas es más controvertida, debido al número limitado de estudios que han evaluado esta cuestión. El valor pronóstico independiente de las mismas en este subgrupo se ha validado de forma retrospectiva en el caso de ColoPrint³⁵ y ColoGuidePro³²⁵, y esta última es la única plataforma con valor pronóstico en pacientes con estadio III ≥ 75 años.

Aunque los resultados de estos perfiles proporcionan información pronóstica relevante, no existe en la actualidad ninguna firma génica con valor predictivo⁴²¹. En el estudio Oncotype se identificó un perfil de 6 genes relacionado con el beneficio de la QT adyuvante basada en 5-FU³²³, pero los resultados no se validaron en la muestra de

pacientes del estudio QUASAR⁴¹⁵. En base a estos datos, en la actualidad las guías de práctica clínica consideran que no se dispone de evidencia suficiente para recomendar la utilización rutinaria de los perfiles de expresión génica en este contexto.

Es importante destacar que las plataformas descritas se caracterizan por presentar un mínimo solapamiento en los genes implicados⁴²², lo cual podría explicarse porque el CCR se compone de entidades moleculares diferentes desarrolladas a partir de la desregulación de distintas vías de señalización. De hecho, la integración de análisis genéticos y epigenéticos a gran escala ha permitido identificar varios subtipos moleculares de CCR^{305,306}. En relación con esto, un estudio francés reciente ha establecido una clasificación molecular de cáncer de colon basándose en el análisis de perfiles de expresión de mRNA⁴²³. Se han identificado 6 subtipos moleculares, dMMR, KRAS mutado, relacionado con células madre tumorales y tres subtipos con inestabilidad cromosómica, con distintas características clínico-patológicas y biológicas y con valor pronóstico independiente en pacientes con estadio II-III.

El significado pronóstico de los perfiles de expresión de microRNAs (miRNAs) también se ha evaluado en estudios recientes. Así, Zhang et al. identificaron una plataforma de 6 miRNAs, miR-21-5p, miR-20a-5p, miR-103a-3p, miR-106b-5p, miR-143-5p y miR-215, que permite clasificar a los pacientes con CCR estadio II en dos grupos con una SLE a 5 años significativamente diferente (89% vs. 60% en el grupo de bajo y alto riesgo, respectivamente; HR=4.24; $p<0.0001$) y cuyo valor pronóstico se ha confirmado en una cohorte independiente (HR=3.70; $p>0.001$)³²⁶. Además, los pacientes en el grupo de alto riesgo presentaron una respuesta favorable a la QT adyuvante (HR=1.69; $p=0.0054$). Finalmente, se han desarrollado perfiles basados en el análisis de RNAs largos no codificantes (lncRNAs) con capacidad de identificar subtipos moleculares con un distinto pronóstico^{424,425}.

La Tabla 12 resumen los principales perfiles de expresión génica estudiados en los estadios iniciales de CCR.

Tabla 12: Perfiles de expresión génica

ESTUDIO	TÉCNICA DE ESTUDIO	TIPO DE MUESTRA	ESTADIO	Nº DE MARCADORES EN EL PERFIL	Nº PACIENTES/MUESTRAS ANALIZADAS	
					DISEÑO	VALIDACIÓN
Oncotype Dx Colon Cancer (O'Connell, 2010) ³⁵	PCR cuantitativa	Tejido parafinado	II-III	12 genes (7 pronóstico y 5 de referencia)	1851	a) Estudio QUASAR (711 pacientes, estadio II) ⁶²⁴ b) Estudio CALGB 9581 (690 pacientes, estadio II) ⁶²⁵ c) Estudio NSABP C-07 (892 pacientes, estadio II-III) ⁶²⁶
Colon PRS (Van Laar, 2010) ⁴¹²	Desarrollado a partir de datos de expresión génica previamente publicados		II-IV	163 genes	Estudio Smith et al (232 pacientes) ⁶¹⁷	Estudio Jorissen et al (60 pacientes, estadios II) ⁶¹⁸
ColoPrint colon cancer recurrence assay (Salazar, 2011) ⁴⁶⁶	Microarrays	Tejido fresco congelado	I-IV	18 genes	188	a) 206 pacientes, estadio I-III b) Estudio Maak (135 pacientes, estadio II) ⁶²⁸ c) Estudio PARSC (501 pacientes, estadio II) ⁶²⁹
Gene Fx, colon (Kennedy, 2011) ⁴¹³	Microarrays	Tejido parafinado	II	634 genes	215	144
OncoDefender-CRC (Lenehan, 2012) ⁴¹⁴	PCR cuantitativa	Tejido parafinado	I-II	5 genes	74	264
ColoGuideEx (Ågesen, 2012) ³²⁴	Microarrays	Tejido fresco congelado	II	13 genes	44	a) 52 b) Estudios de Smith ⁶¹⁷ y Jorissen ⁶¹⁸ (108 pacientes)
ColoGuidePro (Sveen, 2012) ³²⁵	Microarrays	Tejido fresco congelado	II-III	7 genes	172	Estudios de Smith ⁶¹⁷ y Jorissen ⁶¹⁸ (215 pacientes)
ColoLipidGene (Vargas, 2015) ⁴⁰⁷	Array baja densidad	Tejido parafinado	II	4 genes	80	Dos cohortes independientes con estadio II: 119 y 120 pacientes

5. FARMACOGENÓMICA. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS COMO FACTORES PRONÓSTICO Y PREDICTIVOS DE RESPUESTA Y TOXICIDAD A AGENTES QUIMIOTERÁPICOS

5.1. INTRODUCCIÓN

5.1.1. Definición y objetivos de la farmacogenómica

Existen amplias diferencias interindividuales tanto en la respuesta a los agentes antineoplásicos como en la naturaleza y severidad de sus efectos adversos. Aunque factores como la edad, el sexo, la función renal o hepática, la comorbilidad, la dieta o las interacciones medicamentosas pueden modular la eficacia del tratamiento oncológico, uno de los principales determinantes de dicha variabilidad reside en las diferencias en la constitución genética de los genes que codifican proteínas implicadas en la farmacogenética (absorción, distribución, metabolismo y eliminación) y farmacodinámica (efecto del fármaco en su receptor y en otras dianas) de estos agentes⁶⁵⁴⁻⁶⁵⁸.

La farmacogenómica estudia el papel que desempeñan el conjunto de las variaciones genéticas interindividuales en la respuesta y toxicidad a una misma dosis de un determinado agente. Se distingue de la farmacogenética en que ésta se focaliza en el estudio de genes candidatos individuales para identificar marcadores genéticos que afectan al metabolismo de los fármacos o a su efecto biológico. Sin embargo, los dos términos se utilizan con frecuencia indistintamente en la mayoría de los escenarios^{429,431}. Los principales objetivos de los estudios farmacogenómicos son la identificación y caracterización de los polimorfismos de determinados genes, su correlación con los resultados terapéuticos y el desarrollo de tests genéticos que permitan predecir la respuesta, la toxicidad, el fármaco o la dosis más adecuados para un paciente concreto. En definitiva, la personalización del tratamiento en base a cada genotipo individual, con la finalidad de maximizar la eficacia, minimizar la toxicidad y conseguir un beneficio farmacoeconómico^{427,429,431,432}. Estos objetivos adquieren especial importancia en el caso de los agentes antineoplásicos, caracterizados, en general, por su estrecho índice terapéutico.

5.1.2. Tipos de variabilidad genética

Entre los mecanismos biológicos que pueden generar variabilidad genética se encuentran las diferencias en la expresión génica o en la actividad de los factores de transcripción, el silenciamiento génico (epigenética) y los polimorfismos genéticos⁴²⁶.

Los polimorfismos genéticos son alteraciones en la secuencia del ADN en las que la variante alélica menor está presente en más del 1% de la población. A diferencia de las mutaciones, que presentan una frecuencia alélica <1%, estas variaciones suelen ser neutrales y, por tanto, pueden mantenerse de forma estable en la población⁴³³. Ocurren a lo largo de todo el genoma, en promedio, cada 1.000 pares de bases, y pueden asentar en regiones intrónicas, exones o regiones promotoras⁴²⁶⁻⁴²⁸. Las variaciones genéticas más frecuentes son los polimorfismos de nucleótido único (*single nucleotide polymorphism*, *SNP*), siendo otras alteraciones comunes las pequeñas inserciones o deleciones o incluso las deleciones de genes completos. Los SNPs consisten en el cambio de una única base de ADN respecto a la habitualmente presente en esa posición. Suponen más del 90% de las variaciones del genoma humano, con un número estimado del orden de 1 a 10 millones, de los que entre 50.000 y 250.000 se encuentran en genes codificantes o alrededor de los mismos.

Todas las alteraciones en la secuencia del ADN pueden producir cambios en la estructura y actividad de la proteína, cuya repercusión potencial en la eficacia del tratamiento depende, entre otros factores, de su impacto funcional en la actividad proteica, de la relevancia del gen en la farmacocinética y farmacodinámica del agente antineoplásico, así como de la existencia de vías de escape para la eliminación del fármaco. En relación con esto, el locus en el que reside la variante alélica es uno de los principales determinantes de su efecto funcional. Las variantes exónicas pueden alterar la estructura de las proteínas como consecuencia de la sustitución de un aminoácido, introducción de un codón de parada prematuro, creación de una variante de splicing alternativo o alteración en el marco de lectura. La sustitución de aminoácidos es probablemente el efecto mejor conocido de los polimorfismos genéticos y, dependiendo de la función del aminoácido en la proteína, su sustitución puede conllevar un efecto variable en la actividad final de la misma. La mayoría de las alteraciones que asientan en regiones intrónicas no tienen efecto funcional en la proteína, pero pueden crear variantes de splicing alternativo que afecten drásticamente la actividad proteica⁴²⁶⁻⁴²⁸. Respecto a los SNPs sinónimos o silentes, se trata de SNP exónicos que codifican el mismo aminoácido y por lo tanto no suponen un cambio en la estructura primaria de la proteína. Sin embargo, pueden generar

diferencias en la actividad proteica al influir en la estabilidad y la estructura del RNA mensajero o modificar la cinética de la traducción por cambios en los codones o por splicing alternativo. En el caso de polimorfismos en las regiones promotoras o en las regiones no traducidas 3' (3'-UTR) o 5' (5'-UTR) del gen, tampoco se altera la secuencia aminoácidica de la proteína. Sin embargo, se puede afectar significativamente la actividad de la proteína al alterarse la cinética de la transcripción o la traducción. Los microsatélites, también conocidos como número variable de repeticiones en tándem (VNTR), son polimorfismos que ocurren con frecuencia en las regiones promotoras. Se trata de secuencias repetitivas de 20-70 pares de bases que se repiten de forma polimórfica en la población. Otro tipo de alteración genética que contribuye a la variabilidad fenotípica son las variaciones en el número de copias (CNVs). En este caso la secuencia de la proteína no se modifica, pero cuando están presentes múltiples copias del gen, su actividad generalmente se incrementa^{434,435}. Finalmente, pueden aparecer deleciones del gen completo, que implican la no transcripción del mismo y la ausencia de la actividad proteica. La Tabla 13 resume el efecto potencial de los distintos polimorfismos genéticos en la estructura y función proteica.

Tabla 13: Efectos de los polimorfismos en la estructura y función proteica

TIPO DE POLIMORFISMO	EFFECTO EN LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN PROTEICA
SNP no sinónimo en región exónica	Sustitución de aminoácidos, introducción de un codón de parada prematuro o alteración del marco de lectura. Cambio en la estructura y función proteica
SNP sinónimo (silente) en región exónica	Estructura proteica similar, pero actividad diferente por alteraciones en la cinética de traducción del RNA mensajero
SNP en región intrónica no codificante	Pueden inducir variantes de splicing alternativo que afecten a la traducción o estabilidad proteica
SNP en región promotora	Estructura proteica similar, pero la expresión puede estar alterada
Delección/inserción en región codificante	Cambio en la estructura proteica por introducción de codones de parada prematuros o cambios en el marco de lectura
Delección/inserción en región no codificante	Pueden inducir variantes de splicing alternativo que modifiquen la traducción o estabilidad proteica
Microsatélite (número variable de repeticiones en tándem)	Estructura proteica similar, pero la expresión puede estar alterada
Variaciones en el número de copias	Estructura proteica similar, pero la expresión puede estar alterada
Deleciones génicas	No transcripción, ausencia de actividad proteica

5.2. POLIMORFISMOS EN LOS GENES IMPLICADOS EN LA FARMACOLOGÍA DEL 5-FU Y OTRAS FLUOROPIRIMIDINAS

5.2.1. Metabolismo de los compuestos fluoropirimidínicos

Desde su introducción hace más de 50 años⁴³⁶, el 5-FU constituye uno de los fármacos más comúnmente prescritos en el tratamiento de las neoplasias del tracto gastrointestinal y continúa siendo la base de la mayoría de los esquemas de combinación en CCR^{10,12,437}. Su forma nativa es un profármaco inactivo que requiere ser activado intracelularmente para ejercer su efecto citotóxico. Se convierte inicialmente en su derivado desoxiribonucleósido 5-fluoro-2'-dexosiuridina (FUDR) por la acción de la enzima timidina fosforilasa (TP) y la posterior fosforilación de este compuesto por la timidina quinasa (TK) resulta en la formación del metabolito activo 5-fluoro-2'-dexosiuridina monofosfato (FdUMP). La TS cataliza la reacción de metilación de FdUMP a deoxitimidina-5'-monofosfato (dTMP), que posteriormente será fosforilado a deoxitimidina trifosfato (dTTP)⁴³⁸, por lo que se considera una enzima clave para la síntesis de novo de pirimidinas. En presencia del cofactor 5,10-metilentetrahidrofolato (MTHF), el FdUMP forma un complejo ternario covalente estable con la TS, lo cual conduce a la inhibición de la misma y a la consiguiente depleción de dTTP, interfiriendo de esta manera con el proceso de síntesis y reparación del ADN⁴³⁸⁻⁴⁴¹.

Una ruta metabólica alternativa se basa en la conversión directa del 5-FU a fluorouridina monofosfato (FUMP) por la acción de la enzima orotato fosforibosiltransferasa (OPRT). Dicho metabolito se transforma posteriormente en fluorouridina difosfato (FUDP) y finalmente en la forma trifosfato (FUTP), que es la que se incorpora al RNA, provocando el daño del mismo. Además, la FUDP se convierte en FdUMP por acción de la enzima ribonucleótido reductasa (RRM), inhibiendo la TS^{440,441}. El complejo ternario TS-FdUMP-folato se disocia lentamente y los niveles intracelulares de 5,10-MTHF se consideran críticos para la formación de dicho complejo, así como para mantener la inhibición de la enzima. Por eso la administración de leucovorín promueve la citotoxicidad del 5-FU al ampliar las reservas intracelulares de 5,10-MTHF, aumentando de esta manera la duración de la inhibición de la TS^{438,442}.

En cuanto al catabolismo del 5-FU, el 80-85% del fármaco administrado se inactiva a nivel hepático por la acción de la enzima dihidropiridina deshidrogenasa (DPD). Esta enzima cataliza la conversión de 5-FU en un metabolito inactivo, el dihidrofluorouracilo

(DHFU), que se convierte posteriormente en fluoro-beta-alanina (FBAL), la cual se excreta por la orina. Aunque los niveles más altos de DPD del organismo se expresan en el hígado, esta enzima se encuentra ampliamente distribuída en otros tejidos, entre los que se encuentran la mucosa gastrointestinal y los linfocitos periféricos^{440,441}.

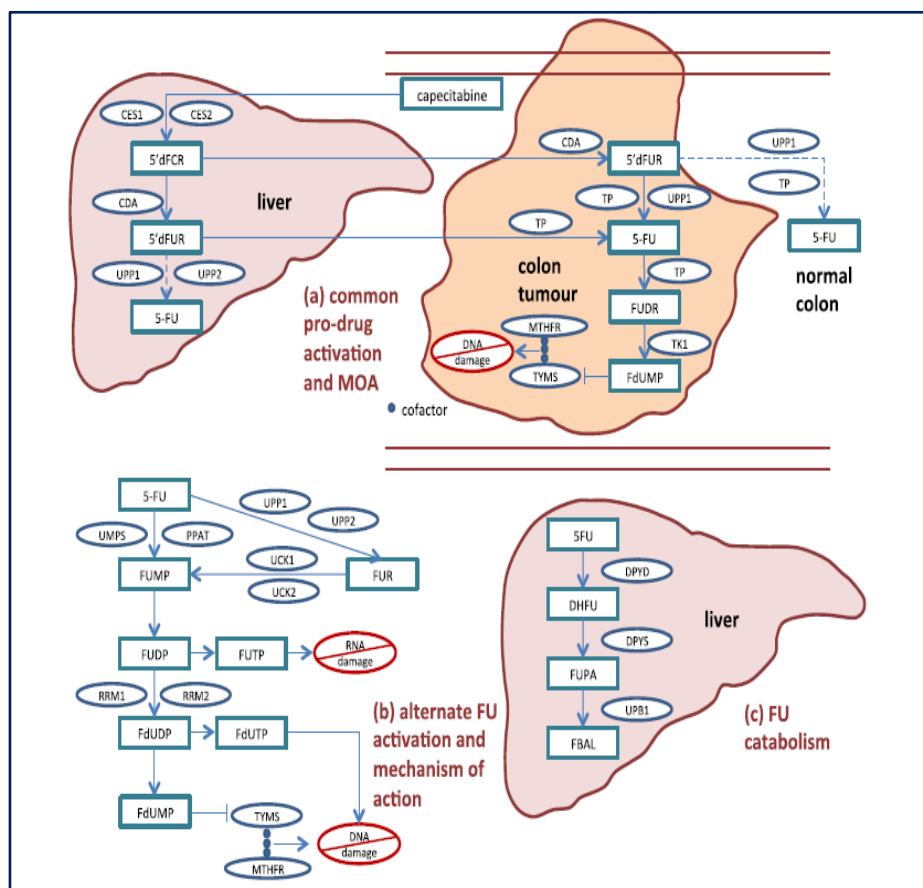
Por otra parte, la capecitabina es una fluoropirimidina oral que se absorbe a nivel intestinal como un profármaco inactivo y se convierte en 5-FU a través de tres reacciones enzimáticas sucesivas. La conversión a 5'-deoxi-5-fluorocitidina (5'-dFCR) por las carboxilesterasas (CES) hepáticas se sigue de la transformación de este metabolito en 5'-doxifluridina (5'-DFUR) por la acción de la citidina desaminasa (CDA), altamente expresada en el hígado. El paso clave consiste en la conversión de 5'-DFUR al compuesto activo, el 5-FU, por medio de la acción de la TP y/o la uridina fosforilasa (UPP)⁴⁴³. Este proceso ocurre tanto en el tumor como en el tejido sano, aunque la expresión de TP es superior en las células tumorales, lo que conduce a unas concentraciones relativas de 5-FU superiores a dicho nivel^{443,444}. Tras la conversión de capecitabina en 5-FU, el resto del metabolismo del fármaco se llevará a cabo siguiendo las vías enzimáticas descritas previamente.

Otra fluoropirimidina oral, el UFT, es una combinación 4:1 molar de tegafur con uracilo. El tegafur se absorbe sin metabolizar a nivel intestinal y se convierte en 5-FU tras hidroxilación hepática a través de la vía del citocromo P450. El uracilo inhibe competitivamente la degradación de 5-FU por medio de la enzima DPD, con lo cual se consiguen concentraciones mantenidas del fármaco tanto a nivel plasmático como tumoral.

La Figura 1 muestra las principales vías implicadas en el metabolismo de las fluoropirimidinas.

Introducción

Figura 1: Vías metabólicas de los compuestos fluoropirimidínicos



Se estima que el 26-65% de las diferencias interindividuales en la citotoxicidad inducida por los compuestos fluoropirimidínicos y la toxicidad derivada de dichos fármacos se explican por una causa genética. Múltiples estudios han evaluado los niveles de expresión de las principales enzimas implicadas en las rutas metabólicas de estos compuestos, así como los polimorfismos de las mismas con el objetivo de establecer una posible correlación con el pronóstico y la predicción de respuesta/toxicidad en relación con los esquemas basados en 5-FU u otras fluoropirimidinas como capecitabina o tegafur^{38-41,445,446}.

Los polimorfismos más frecuentes en los genes TS, DPD, MTHFR y OPRT y su potencial repercusión funcional en las proteínas implicadas en la farmacología de los compuestos fluoropirimidínicos se resumen en la Tabla 14.

Tabla 14: Polimorfismos comunes en la farmacología de las fluoropirimidinas y su repercusión funcional

dbSNPrs ID	POLIMORFISMO	ALELOS	REPERCUSIÓN FUNCIONAL
TIMIDILATO SINTETASA (TS)			
rs34743033	VNRT 5'-UTR TSER*2/TSER*3	(CCGCGCCACTTCGACCTGCCTCCGTTCCCG)/2/3	Alelo TSER*3: Mayor eficiencia transcripcional y expresión de TS
rs2853542	SNP 5'- UTR TSER*3 G>C	C>G	Alelo TSER*3C: Menor actividad transcripcional y expresión de TS
rs151264360	Del/Ins 3'- UTR TS 1494del6pb	-/TTAAAG	Delección -6pb: Menor estabilidad de mRNA y expresión de TS Inserción +6pb: Mayor estabilidad de mRNA y expresión de TS
DIHIDROPIRIMIDINA DESHIDROGENASA (DPD)			
rs3918290	SNP DPD*2A, IVS14+1 G>A	G>A	Traslocación de guanina (G) a adenosina (A) en el sitio de splicing 5' del intrón 14, que provoca la delección del exón 14 y general una enzima inactiva
rs1801159	SNP DPD*5, 1627 A>G	A>G	Sustitución Ile → Val en el codón 166 del exón 6 que reduce la expresión proteica
rs1801160	SNP DPD*6, 2194 G>A	G>A	Sustitución Val → Ile en el codón 732 del exón 18 que reduce la expresión proteica
rs1801265	SNP DPD*9A, 85 T>C	T>C	Sustitución Cys → Arg en el codón 29 del exón 2 que reduce la expresión proteica
rs55886062	SNP DPD*13, 1679 T>G	T>G	Sustitución Ile → Ser en el codón 560 del exón 13 que puede desestabilizar el dominio de unión FMN (flavín mononucleótido)
rs6736098	SNP 2846 A>T	A>T	Sustitución Asp → Val en el codón 949 del exón 22 , próximo a un dominio Fe-S, que altera el transporte de electrones y reduce la actividad de la DPD
METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA (MTHFR)			
rs1801133	SNP 677 C>T	C>T	Sustitución Ala → Val en el codón 222 del exón 4 que reduce la actividad enzimática
rs1801131	SNP 1298 A>C	A>C	Sustitución Glu→ Ala en el codón 429 del exón 7 que reduce la actividad enzimática
OROTATO FOSFORIBOSIL TRANSFERASA (OPRT)			
rs1801019	SNP 638 G>C	G>C	Sustitución Gly→ Ala en el codón 213 del exón 12 que aumenta la actividad enzimática

5.2.2. Polimorfismos de la timidilato sintetasa (TS)

Como se ha comentado anteriormente, la TS es la enzima limitante de la síntesis *de novo* de los nucleótidos pirimidínicos, por lo que desempeña un papel fundamental en la síntesis y reparación de ADN y, consecuentemente, en la replicación celular. Se considera una diana clave del tratamiento con fluoropirimidinas^{426,447}, ya que múltiples estudios y dos meta-análisis han demostrado que su actividad antitumoral y toxicidad se relaciona de forma inversa con los niveles de mRNA de la TS o su expresión proteica^{42,448-450}. Se han descrito varios polimorfismos germinales con repercusión funcional en el gen de la TS. Los tres estudiados en mayor medida, localizados en las regiones no traducidas 5'-UTR y 3'-UTR, son un polimorfismo consistente en un número variable de secuencias de 28 pares de bases (pb) repetidas en tándem por duplicado (2R) o triplicado (3R) en la región promotora TSER (rs34743033, TSER 2R>3R), un SNP G>C en la segunda repetición cuando están presentes tres repeticiones (rs2853542, TSER*3 G>C) y un polimorfismo por delección de 6 pb en la región 3'UTR (+6pb/-6pb 3'-UTR) (rs34489327,14946pb) (Tabla 14)^{426,447,451}.

5.2.2.1. Polimorfismos en la región 5'-UTR: TSER 2R>3R y TSER*3 G>C

La región 5'-UTR del gen de la TS presenta características estructurales únicas, ya que el 80% de su contenido son nucleótidos de guanina y citosina y está constituida por secuencias de 28 pb repetidas en tándem⁴⁵¹. La función de esta región no está completamente caracterizada, aunque se sabe que al menos una secuencia repetida es necesaria para poner en marcha el proceso de transcripción génica⁴⁵². Las repeticiones en tándem contienen el dominio de unión del factor de transcripción USF1⁴⁵³, por lo que el aumento del número de repeticiones podría aumentar la cantidad de sitios de unión de dicho factor, aumentando de esta forma su capacidad transcripcional^{452,454}. También se ha sugerido que el número de repeticiones podría modificar la actividad enzimática de la TS, aumentando su eficiencia translacional a mayor número de secuencias repetidas^{452,454,455}.

El polimorfismo más estudiado en la región 5'-UTR consiste en un número variable de secuencias de 28 pb repetidas en tándem⁴⁵⁵. Aunque se han descrito alelos que contienen 2, 3, 4, 5 y 9 copias, aquellos con 2 (TSER*2) y 3 (TSER*3) repeticiones son los más habituales, permitiendo definir 3 posibles genotipos (TSER*2/TSER*2, TSER*2/TSER*3 y TSER*3/TSER*3). El segundo polimorfismo en esta región consiste en la sustitución de una citosina por una guanina en el duodécimo nucleótido de la segunda repetición del alelo TSER*3 (TSER*3 G>C SNP), lo que da lugar a dos alelos

adicionales en ese locus (TSER*3G o TSER*3C)^{453,456}. Esta sustitución polimórfica modifica un residuo crítico en el factor de transcripción USF, lo que abole el lugar de unión dentro de TSER, alterando su actividad transcripcional. Varios trabajos han objetivado que los pacientes portadores de alelos TSER*3 presentan un incremento significativo de los niveles intratumorales del mRNA de la TS y de su actividad enzimática respecto a aquellos con la variante TSER*2^{452,457-459}, aunque estos resultados no se han confirmado en todos los estudios^{460,461}. También se ha demostrado que los niveles de expresión de la TS pueden modificarse en función del TSER*3 G>C SNP^{453,455,459}. Así, el alelo TSER*3C se asocia con niveles de expresión reducidos y menor actividad transcripcional que el TSER*3G, comparable con la del alelo TSER*2, por lo que pueden distinguirse tres fenotipos en función de estos tres alelos (TSER*2, TSER*3G y TSER*2G): baja actividad (*2/*2 o *2/*3C o *3C/*3C), actividad intermedia (*2/*3G o *3C/*3G) y actividad alta (*3G/*3G)⁴⁵³.

Múltiples estudios retrospectivos y prospectivos han analizado los polimorfismos de la región 5'UTR de la TS y su impacto en el pronóstico y la toxicidad en pacientes tratados con fluoropirimidinas^{40,438,457,462-497}. La mayoría de ellos objetivan una mayor actividad enzimática en portadores de genotipos asociados a niveles de expresión altos de TS que en los que presentan niveles bajos, lo cual se traduce en una menor tasa de respuesta, una supervivencia desfavorable y una menor incidencia de eventos adversos^{40,438,457,462,464,465,769,772,473,475,478-482,487,493,496,497}. Sin embargo, algunos trabajos no han encontrado diferencias significativas^{466,470,474,476,483-486,488,489,494,495} o incluso han demostrado una asociación opuesta^{463,467,468,471,477} (Tabla 15).

5.2.2.2. Polimorfismo por delección de 6 pb en la región 3'-UTR (+6bp/-6bp 3'-UTR)(1494del6pb)

Un tercer polimorfismo consiste en una inserción/delección de una secuencia de 6 pb (TTAAAG) en la posición 1494 de la región 3'-UTR del gen, cuya frecuencia alélica en la población caucásica es de 27-29%⁴⁹⁸. Varios trabajos *in vitro* han demostrado que esta delección se asocia con una menor estabilidad de la estructura del mRNA y una expresión proteica intratumoral reducida⁴⁹⁹. Aunque algunos estudios sugieren que los pacientes homocigotos -6pb/-6pb presentan un pronóstico favorable, una mayor sensibilidad a la QT basada en fluoropirimidinas y una mayor toxicidad^{40,468,470,492} respecto a aquellos +6pb/+6pb, otros trabajos no han confirmado esta asociación^{465-467,476,481-484,486-491}, por lo que su relevancia clínica es controvertida en la actualidad (Tabla 15). Sin embargo, el valor predictivo de esta variante podría incrementarse cuando se estudia en combinación con los polimorfismos de la región 5'-UTR^{40,467,468}.

Tabla 15: Estudios farmacogenómicos de TS en el tratamiento adyuvante del CCR

ESTUDIO (AÑO)	Nº PACIENTES/TRATAMIENTO	ASOCIACIÓN CON EFICACIA	ASOCIACIÓN CON TOXICIDAD
Ruzzo A (2014) ⁴⁷⁶	517 pacientes (TOSCA) FOLFOX4/CAPOX adyuvante	-	No asociación de los polimorfismos 5'-UTR y 3'-UTR con la toxicidad
Rosmarin D (2014) ⁴³⁸	927 pacientes (QUASAR 2) 4855 pacientes (revisión sistemática) 5-FU/capecitabina en monoterapia o combinación con oxaliplatino	-	Mayor toxicidad por capecitabina en portadores de los alelos TSER*2 y -6bp
Lee KH (2013) ⁴⁷⁷	292 pacientes FOLFOX adyuvante	Los genotipos TSER*2R/3G, TSER*3C/3G y TSER*3G/3G se asocian con mejor SLE	-
Afzal S (2011) ⁴⁷¹	2 cohortes: 302 y 290 pacientes QT adyuvante basada en 5-FU	Los genotipos TSER*3/ TSER*3 y TSER*2/ TSER*2+6pb/+6pb se asocian con mejor SLE/SG	-
Afzal S (2011) ⁴⁷⁰	2 cohortes: 161 y 340 pacientes QT adyuvante basada en 5-FU	-	Los genotipos -6pb/-6pb o MTHFR 1298 A/A +6pb/-6pb se asocian con mayor toxicidad
Fariña-Sarasqueta A (2011) ⁴⁶⁹	251 pacientes QT adyuvante basada en 5-FU	No asociación de los polimorfismos 5'-UTR y 3'-UTR con la toxicidad	-
Gusella M (2009) ⁴⁶⁶	130 pacientes FOLFOX4/CAPOX adyuvante	No asociación de los polimorfismos 5'-UTR y 3'-UTR con el pronóstico	No asociación de los polimorfismos 5'-UTR y 3'-UTR con la toxicidad
Lurje G (2008) ⁴⁰	197 pacientes QT adyuvante basada en 5-FU	El haplotipo TSER*3G/+6pb se asocia con una SLE desfavorable	-
Gosens MJ (2008) ⁴⁶⁵	38 pacientes QT adyuvante basada en 5-FU	El genotipo TSER*3/ TSER*3 se asocia con una SLE/SG desfavorable	-
Dotor E (2006) ⁴⁶⁸	129 pacientes QT adyuvante basada en 5-FU+LV/levamisol	Los genotipos TSER*3/ TSER*3 y -6pb/-6pb se asocian con mejor pronóstico. El haplotipo TSER*3/-6pb se asocia con mejor SG	-
Hitre E (2005) ⁴⁶⁷	166 pacientes QT adyuvante basada en 5-FU	Los genotipos TSER*3/ TSER*3 y TSER*2/TSER*3 +6pb/+6pb se asocian con mejor SLE/SG	-
Tsuji T (2003) ⁴⁶³	135 pacientes CT adyuvante con fluoropirimidinas orales	No asociación del polimorfismo 5'-UTR TSER 2R>3R con el pronóstico	-

5.2.3. Polimorfismos de dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD)

La DPD es la enzima limitante del catabolismo de las fluoropirimidinas, por lo que desempeña un papel crítico en la inactivación de estos compuestos^{440,441}. Por ello, la actividad variable de dicha enzima es uno de los factores claves que determinan la exposición tisular a estos fármacos y las diferencias interindividuales en su eficacia y toxicidad. Aproximadamente el 3-5% de la población general presenta una deficiencia parcial en la actividad de DPD, mientras que su pérdida total afecta sólo al 0.2%⁵⁰⁰. Estas deficiencias enzimáticas pueden explicarse por la presencia de alteraciones moleculares en el gen DPD (mutaciones⁵⁰¹, SNPs^{502,503}), aunque también pueden verse influenciadas por factores epigenéticos, alimentarios o ambientales^{504,505}.

Se han descrito más de 15000 polimorfismos en el gen DPD, aunque sólo algunos tienen repercusión funcional. De todos ellos, la variante DPD*2A (rs3918290, IVS14+1G>A) representa el 40-50% de los alelos no funcionantes conocidos, debido a que la traslocación de guanina (G) a adenina (A) en el sitio de splicing 5' del intrón 14, provoca la delección del exón, y como consecuencia, se genera una proteína defectuosa que se degrada rápidamente dando lugar a una deficiencia parcial o completa de la actividad de DPD⁵⁰⁶. Otros polimorfismos relativamente comunes con consecuencias fenotípicas son DPD*5 (rs1801159, 1627 A>G), *6 (rs1801160, 2194 G>A), *9A (rs1801265, 85 T>C) y *13 (rs55886062, 1679 T>G)⁵⁰⁷, o los recientemente identificados rs67376798 (2846 A>T), rs115232898 (557 A>G), rs12132152 (97057448 G>A) y rs12022243 (1906-14763 G>A)^{474,508} (Tabla 14).

En los últimos años numerosos trabajos han estudiado la asociación de los polimorfismos en el gen DPD con los niveles de expresión de DPD intratumoral y su actividad enzimática, tratando de correlacionar dichos parámetros con el pronóstico, la predicción de respuesta y la toxicidad de las fluoropirimidinas^{38,441,471,493,494,493,494,496,504-544}. *In vitro*, la actividad de DPD en las células tumorales ha demostrado ser un factor independiente relacionado con la sensibilidad a estos fármacos⁵⁰⁹⁻⁵¹². Así, los niveles de expresión bajos conllevan una reducción del catabolismo del 5-FU y una mayor concentración intracelular del mismo, mientras que una actividad enzimática elevada implica el desarrollo de resistencias mediante la reducción de su efecto citotóxico. En la clínica, aunque algunos estudios llevados a cabo en el contexto adyuvante o en la enfermedad avanzada han demostrado que los pacientes con baja expresión de DPD tratados con fluoropirimidinas presentan una supervivencia superior que aquellos con expresión elevada^{441,465,513-519}, otros trabajos no han podido confirmar estos datos⁵²⁰⁻⁵²³, por lo que su valor predictivo en relación con la eficacia continúa siendo controvertido.

En lo referente a la toxicidad, grandes estudios prospectivos^{524-526,544} así como trabajos retrospectivos de menor tamaño^{38,474,496,527-539} y dos meta-análisis recientes^{438,540} han demostrado de forma consistente que determinados polimorfismos de DPD, fundamentalmente DPD*2A, *13 y rs67376798, se asocian con una actividad enzimática reducida de DPD, una menor eliminación y mayor exposición a los compuestos fluoropirimidínicos y, en consecuencia, un aumento de toxicidad severa dosis-dependiente. En base a estos datos, varios grupos de trabajo han establecido recomendaciones respecto a la individualización de dosis de fluoropirimidinas en función de los distintos genotipos⁵⁴¹⁻⁵⁴³. En general, se acepta que los pacientes heterocigotos para las variantes no funcionales de DPD presentan una deficiencia parcial de DPD (30-70% de la actividad enzimática de la población normal), recomendándose iniciar el tratamiento con una reducción de al menos el 50% de la dosis habitual e ir ajustando la misma en función de la tolerancia. Los pacientes homocigotos para las variantes DPD*2A, *13 o rs67376798 presentan una deficiencia enzimática completa, por lo que no se recomienda el empleo de compuestos fluoropirimidínicos. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los resultados descritos no han podido replicarse de forma uniforme en todos los estudios^{493,494,545,546}, lo cual puede explicarse en parte por la existencia de diferencias sustanciales en los esquemas de tratamiento utilizados de unos a otros o por el empleo concomitante de fármacos con capacidad de potenciar el efecto de los alelos de riesgo^{504,524}. Además, la presencia de polimorfismos asociados con una actividad enzimática reducida no implica necesariamente el desarrollo de toxicidad severa, ya que sólo el 50% de los portadores heterocigotos presentan eventos adversos grado 3-4^{504,524}. Se estima que el valor predictivo positivo de las variantes DPD*2A y *13 es del 62% y su valor predictivo negativo del 95%, lo cual sugiere una regulación alélica o compensación en el segundo alelo por variantes no bien caracterizadas, aumentando así la actividad enzimática de DPD^{38,504,524}. En relación con esto, algunos estudios recientes sugieren que >20% (23.3-38%) de los eventos adversos de las fluoropirimidinas pueden explicarse por el efecto combinado de múltiples variantes y que el estudio de haplotipos podría mejorar la capacidad predictiva de los polimorfismos individuales de cara a identificar pacientes con mayor riesgo de desarrollar toxicidad severa^{38,471,525}.

La Tabla 16 resume los principales estudios que han evaluado la asociación potencial de los polimorfismos de DPD con la toxicidad por fluoropirimidinas.

Tabla 16: Principales estudios farmacogenómicos de DPD en relación con la toxicidad por fluoropirimidinas en CCR

ESTUDIO (AÑO)	Nº PACIENTES/TRATAMIENTO	ASOCIACIÓN CON EFICACIA/TOXICIDAD
Rosmarin D (2015) ⁴⁷⁴	119 pacientes tratados con capecitabina +/- bevacizumab adyuvante (QUASAR 2)	Los polimorfismos DPD rs12132152 y rs12022243 se asocian con una incidencia superior de toxicidad
Rosmarin D (2014) ⁴³⁸	927 pacientes (QUASAR 2) y 4855 pacientes (revisión sistemática) 5-FU/capecitabina+/- oxaliplatino adyuvante	Los polimorfismos IVS14+1G>A y 2846 A>T implican un mayor riesgo de toxicidad grado 3-5 por capecitabina+/- bevacizumab (QUASAR2) o fluoropirimidinas+/- oxaliplatino (revisión sistemática)
Lee Am (2014) ⁵⁴⁴	2594 pacientes estadio III Adyuvancia con FOLFOX/FOLFIRI+/- cetuximab	Los polimorfismos IVS14+1G>A y 2846 A>T se asocian con una incidencia superior de toxicidad grado 3-4
Terrazzino S (2013) ⁵⁴⁰	Meta-análisis asociación variantes IVS14+1G>A y 2846 A>T y toxicidad por fluoropirimidinas	El polimorfismo IVS14+1G>A implica un riesgo superior de toxicidad global, hematológica, mucositis y diarrea ≥ grado 3. El polimorfismo 2846 A>T implica mayor riesgo de toxicidad global y diarrea ≥ grado 3
Saif MW (2013) ⁵²⁹	227 pacientes caucásicos 5-FU/capecitabina	El 12% de los pacientes con toxicidad grado 3-4 presentan mutaciones deletéreas en DPD: 5% IVS14+1 G>A, 5% rs67376798, 2% otras
Deenen MJ (2011) ⁵²⁵	568 pacientes con cáncer de colon metastásico 1ª línea: oxaliplatino+capecitabina+bevacizumab+/- cetuximab (CAIRO-2)	Todos los portadores del polimorfismo IVS14+1 G>A desarrollan toxicidad grado 3-4. El 71% (5/7), 63% (5/8) y 50% (14/28) de portadores de genotipos DPD IVS14+1 G>A, 2846A>T y 1236G>A presentan diarrea grado 3-4
Afzal S (2011) ⁴⁷⁰	2 cohortes: 340 y 161 pacientes con cáncer de colon QT adyuvante basada en 5-FU	No se encuentra asociación entre los polimorfismos IVS14+1 G>A, 85 T>C, 496 A>G y 1627 A>G y el desarrollo de toxicidad
Boige V (2010) ⁴⁶⁹	349 pacientes con cáncer de colon metastásico 1ª línea de QT basada en 5-FU (FFCD 2000-05)	No se encuentra asociación entre el polimorfismo IVS14+1 G>A con el pronóstico o la toxicidad
Kristensen MH (2010) ⁴⁹⁶	122 pacientes con cáncer de colon QT basada en fluoropirimidinas	Los pacientes portadores de las variantes IVS14+1 G>A o 1896 C>T presentan un mayor riesgo de desarrollar toxicidad
Amstutz U (2009) ³⁸	111 pacientes QT basada en fluoropirimidinas	El haplotipo formado por los SNPs IVS14+1G>A, 2846 A>T, 1679 T>G y 1236G>A está presente en el 62.5% de los pacientes que desarrollaron toxicidad severa
Braun MS (2009) ⁴⁹⁴	688 pacientes con cáncer de colon avanzado QT basada en fluoropirimidinas (FOCUS)	No se encuentra asociación entre polimorfismo IVS14+1 G>A y el desarrollo de toxicidad
Sulzyc-Bielicka V (2008) ⁵³⁵	252 pacientes con cáncer de colon QT adyuvante basada en fluoropirimidinas	El polimorfismo IVS14+1G>A se relaciona con un mayor riesgo de desarrollar toxicidad hematológica severa
Schwab M (2008) ⁵⁰⁴	683 pacientes Monoterapia con fluoropirimidinas	Los pacientes portadores de la variante IVS14+1 G>A presentan un mayor riesgo de toxicidad global, mucositis y leucopenia

5.2.4. Polimorfismos de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)

La MTHFR es una enzima crítica en la homeostasis del folato intracelular, ya que cataliza la conversión irreversible de 5,10-MTHF a 5-MTHF, principal donante de los grupos metilo necesarios para la remetilación de la homocisteína a metionina. Posteriormente, la metionina se activa a S-adenosilmetionina, lo cual conlleva la metilación del ADN. Además, el efecto citotóxico del 5-FU es altamente dependiente de la concentración de folato. Como se ha explicado previamente, la TS cataliza la conversión de FdUMP a dTMP, reacción en la que el cofactor 5,10-MTHF actúa también como donante de grupos metilo. En presencia de 5,10-MTHF, el FdUMP forma un complejo ternario covalente estable con la enzima TS que inhibe de forma irreversible su actividad, con la consiguiente depleción intracelular de dTTP y reducción de la síntesis de nucleótidos^{442,547}. Por tanto, el incremento de las concentraciones de 5,10-MTHF como consecuencia de SNPs que conllevan una reducción de la actividad enzimática de la MTHFR podría mejorar el efecto citotóxico de estos compuestos al incrementar la formación y estabilidad del complejo ternario 5,10-MTHF-FdUMP-TS y, por tanto, inhibir más eficazmente la síntesis de ADN⁵⁴⁸. Entre los múltiples SNPs en el gen de la MTHFR que se han descrito en la literatura, los dos más comunes y mejor caracterizados son el rs1801133 (677 C>T) y el rs1801131 (1298 A>C), ambos asociados con una reducción de la actividad de la MTHFR, un incremento de los niveles de homocisteína y una alteración en el metabolismo del folato intracelular^{39,442,547} (Tabla 14).

5.2.4.1. Polimorfismo rs1801133 (677 C>T)

El SNP rs1801133 (677 C>T) conlleva la sustitución de una alanina por una valina en el dominio catalítico de la MTHFR (Ala222Val), lo cual implica una reducción significativa de su actividad enzimática⁵⁴⁹. Se ha documentado una variabilidad étnica importante, con una frecuencia del alelo mutado que oscila entre el 10 y el 50%⁵⁵⁰.

Varios estudios *in vitro* e *in vivo* han observado que la presencia del alelo 677T se asocia a una mayor quimiosensibilidad en líneas celulares de CC^{551,552}, lo que sugiere que este SNP es capaz de predecir la eficacia de la QT basada en fluoropirimidinas. Sin embargo, los estudios clínicos que han evaluado el potencial valor predictivo de esta variante tanto en el contexto adyuvante como en la enfermedad avanzada han obtenido resultados no concluyentes o incluso contradictorios^{40,438,466,470,471,474,476,477,483,485,493,494,496,497,504,534,553-571}. Aunque algunos

trabajos han objetivado que el alelo 677T conlleva un efecto positivo en supervivencia^{488,534,553,557,560,566} y una mayor incidencia de eventos adversos^{466,477,554,555,563,565}, otros estudios no han evidenciado ninguna asociación^{40,438,466,471,474,476,485,489,493,494,496,497,504,548,556,558,559,561,562,564,568,569,571} o incluso han demostrado un efecto negativo del alelo 677T^{483,554,563,567,570} (Tabla 17).

5.2.4.2. Polimorfismo rs1801131 (1298 A>C)

El SNP rs1801131 implica la sustitución del aminoácido glutamina por alalina en el dominio regulador de la MTHFR (Glu429Ala), lo que supone una disminución del 30-40% de su actividad enzimática⁵⁷¹. La frecuencia observada del alelo mutado 1298C es de aproximadamente el 25-33%. Aunque en la mayoría de los estudios publicados el genotipo 1298 A/C-C/C no es capaz de predecir el pronóstico de los pacientes tratados con fluoropirimidinas^{40,438,466,471,474,476,477,483,489,496,548,555,556,558-561} o el desarrollo de toxicidad^{438,474,488,548,569}, algunos trabajos recientes han demostrado su valor pronóstico positivo^{488,493,534,565,567}, mientras que en otros se ha asociado con una supervivencia desfavorable^{557,563,568,571}. Además, algunos estudios sugieren que la correlación entre este polimorfismo y la eficacia del tratamiento es significativa únicamente en subgrupos específicos, como los pacientes con cáncer de recto⁵⁶³ o el sexo femenino^{559,568} (Tabla 17).

Finalmente, los estudios de haplotipos muestran que los polimorfismos 677 C>T y 1298 A>C presentan un alto desequilibrio de ligamiento⁵⁷². No se han encontrado individuos homocigotos para las dos variantes alélicas (677T/T-1298C/C), lo que sugiere que dicho genotipo condiciona un fenotipo no viable^{572,573}. Sin embargo, los pacientes heterocigotos son bastante comunes (15-23% de la población caucásica)⁵⁷². Varios trabajos han demostrado un efecto sinérgico de estas dos variantes en la función de la MTHFR^{572,574,575} y que la combinación de las mismas^{470,488,569} o con otros polimorfismos como los de la TS⁴⁷⁰ proporciona información pronóstica más precisa que si se consideran individualmente.

Los resultados inconsistentes de estos trabajos impiden establecer conclusiones definitivas, por lo que son necesarios estudios prospectivos a gran escala para establecer el impacto pronóstico real de los SNPs de la MTHFR en la práctica clínica.

Tabla 17: Principales estudios farmacogenómicos de MTHFR en pacientes con CCR tratados con QT adyuvante

ESTUDIO (AÑO)	Nº PACIENTES/TRATAMIENTO	ASOCIACIÓN CON EFICACIA	ASOCIACIÓN CON TOXICIDAD
Rosmarin D (2015) ⁴⁷⁴	119 pacientes tratados con capecitabina +/- bevacizumab adyuvante (QUASAR 2)	-	No asociación de los polimorfismos rs1801133 y rs1801131 con la toxicidad
Cecchin E (2014) ⁵⁷¹	262 pacientes estadio II-III Fluoropirimidinas +/- oxaliplatino adyuvante	Los pacientes con genotipo rs1801131 C/C presentan peor pronóstico	
Ruzzo A (2014) ⁴⁷⁶	517 pacientes (TOSCA) FOLFOX4/CAPOX adyuvante	-	No asociación de los polimorfismos rs1801133 y rs1801131 con la toxicidad
Rosmarin D (2014) ⁴³⁸	927 pacientes (QUASAR 2) 4855 pacientes (revisión sistemática) 5-FU/capecitabina +/- oxaliplatino adyuvante	-	No asociación de los polimorfismos rs1801133 y rs1801131 con la toxicidad
Zhu L (2013) ⁵⁶⁴	411 pacientes estadios I-III 44.5% QT adyuvante	No asociación de los polimorfismos rs1801133 y rs1801131 con el pronóstico	-
Lee KH (2013) ⁴⁷⁷	292 pacientes estadio II-III FOLFOX adyuvante	No asociación de los polimorfismos rs1801133 y rs1801131 con el pronóstico	Mayor neutropenia en portadores del genotipo rs1801133 T/T
Jennings B (2012) ⁴⁹⁷	Meta-análisis 39 estudios (2402 pacientes). 5-FU+capecitabina	No impacto pronóstico del polimorfismo rs1801133	No asociación del polimorfismo rs1801133 con la toxicidad
Afzal S (2011) ⁴⁷⁰	2 cohortes: 161 y 340 pacientes QT adyuvante basada en 5-FU	-	Los genotipos rs1801133 T/T + rs1801131 A/A-A/C-C/C, C/T+A/C-C/C o C/C+C/C se asocian a menor toxicidad digestiva
Afzal S (2011) ⁴⁷¹	2 cohortes: 290 y 302 pacientes QT adyuvante basada en 5-FU	No asociación de los polimorfismos rs1801133 y rs1801131 con el pronóstico	-
Taflin H (2011) ⁵⁶³	150 pacientes estadio III QT adyuvante	Mejor pronóstico en portadores del genotipo rs1801133 C/C	Menor riesgo de náuseas y parestesias en portadores del genotipo rs1801133 C/C
Derwinger K (2009) ⁵⁵⁴	554 pacientes QT basada en fluoropirimidinas	Peor pronóstico en pacientes con estadio III y genotipo rs1801133 C/T-T/T	Mayor toxicidad en pacientes con el genotipo rs1801133 C/T-T/T
Lurje G (2008) ⁴⁰	197 pacientes estadios II-III QT adyuvante basada en 5-FU	No asociación de los polimorfismos rs1801133 y rs1801131 con el pronóstico	-
Gusella M (2008) ⁴⁶⁶	130 pacientes estadios II-III QT adyuvante basada en 5-FU/LV	No asociación de los polimorfismos rs1801133 y rs1801131 con el pronóstico	El genotipo rs1801133 C/C se asocia a menor toxicidad grado 3-4

5.2.5. Polimorfismos de la orotato fosforibosiltransferasa (OPRT)

El gen uridina monofosfato sintetasa (UMPS) codifica la enzima OPRT, responsable de la conversión del 5-FU a su metabolito activo FUMP^{576,577}. Varios estudios recientes han objetivado que el aumento de su actividad enzimática o de sus niveles de expresión se asocia con una supervivencia prolongada en pacientes tratados con QT adyuvante basada en fluoropirimidinas^{441,520,521,578-581}, aunque estos resultados no han podido confirmarse en todos los trabajos realizados⁵¹⁶. Además, en un análisis retrospectivo del estudio CAIRO, los niveles de expresión elevados de OPRT en las células del estroma demostraron ser un factor pronóstico favorable, mientras que en las células tumorales predecían un pronóstico adverso⁵⁸². Estos resultados inesperados podrían explicarse por el posible papel diferencial de ambos compartimentos en el pronóstico de los pacientes, aunque el mecanismo subyacente continúa siendo desconocido.

Se han descrito múltiples SNPs en el gen UMPS, entre los que destacan 286A>G (Arg96Gly), 1285G>C (Gly429Arg), 326T>G (Val109Gly) y 638G>C (Gly213Ala) (Tabla 16)^{470,471,583-586}. Varios estudios han evaluado el efecto de algunos de ellos (638G>C, 1050T>A y 1336 A>G) en pacientes con CCR tratados con QT basada en 5-FU, sin encontrar asociación entre ninguna de estas variantes y la eficacia del tratamiento^{471,583} o el desarrollo de toxicidad⁴⁷⁰. Sin embargo, estudios *in vitro* han demostrado que el SNP 638G>C contribuye a incrementar la actividad enzimática de la OPRT⁵⁸⁷. En relación con esto, varios trabajos clínicos han objetivado una toxicidad más severa tras la exposición a 5-FU en portadores del alelo C⁵⁸⁴ fundamentalmente diarrea grado 3 y anorexia grado 2-3⁵⁸⁵. El mecanismo propuesto para explicar la toxicidad gastrointestinal se relaciona fundamentalmente con la incorporación del 5-FU a RNA (F-RNA), pero no con la inhibición de la biosíntesis de dTMP por la conversión de 5-FU a FdUMP⁵⁸⁸. Por tanto, la administración de 5-FU/LV a pacientes con una actividad enzimática de OPRT aumentada, sobre todo aquellos con el genotipo homocigoto 638 C/C, conlleva un incremento significativo de los niveles de F-RNA en los enterocitos, lo cual puede aumentar la probabilidad de diarrea severa⁵⁸⁵.

Todavía hay muchos factores desconocidos que junto con los SNPs en el gen UMPS pueden explicar la quimiosensibilidad y los mecanismos de resistencia a 5-FU, lo que pone de manifiesto la necesidad de estudiar otras regiones del gen incluyendo las regiones promotoras y reguladoras. La ausencia de datos concluyentes acerca de la correlación entre la expresión de UMPS/OPRT y la eficacia del tratamiento con fluoropirimidinas impide determinar su valor clínico potencial en la actualidad.

5.3. POLIMORFISMOS EN LOS GENES IMPLICADOS EN LA FARMACOLOGÍA DEL OXALIPLATINO

5.3.1. Metabolismo y mecanismo de acción del oxaliplatino

El oxaliplatino (trans-1-diaminociclohexano oxalatoplatino) es un platino de tercera generación ampliamente utilizado en el tratamiento del CCR, cuya estructura consiste en un átomo central de platino rodeado por grupos 1,2-diaminociclohexano y por un ligando de oxalato⁵⁸⁹. La captación y flujo de salida del fármaco de la célula determina la concentración intracelular del mismo y está mediada por varios transportadores de superficie, de los que destacan los transportadores de cationes orgánicos (OCTs) 1, 2 y 3 (SLC22A1, SLC22A2 y SLC22A3), que desempeñan un papel crítico no sólo en la captación del mismo sino también en su citotoxicidad⁵⁹⁰. Otras proteínas relevantes son los transportadores cúpricos (CTR1) SLC31A1 y 2, que median su captación intracelular, y las ATPasas tipo P ATP7A y ATP7B, que promueven la salida del fármaco y su secuestro en los compartimentos subcelulares⁵⁹¹⁻⁵⁹³.

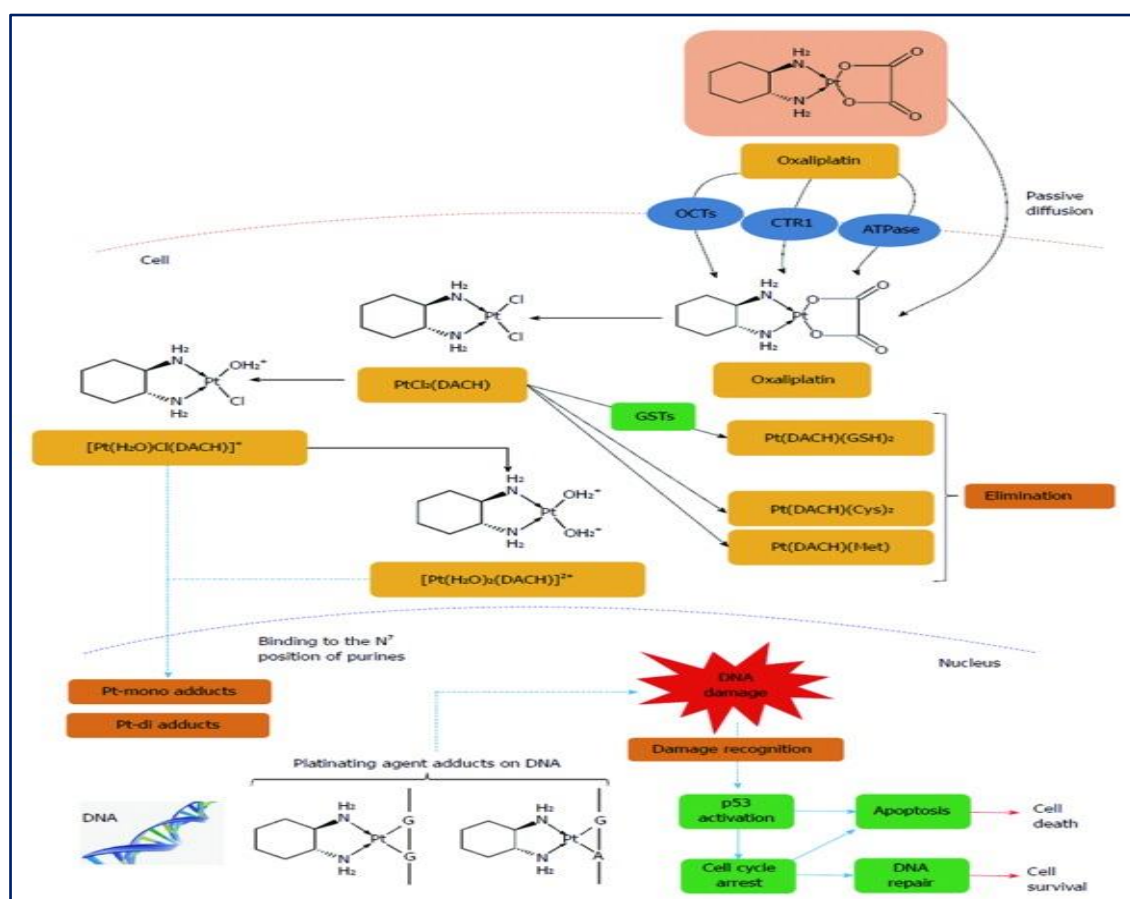
Una vez en el interior de la célula, el profármaco del oxaliplatino se activa mediante hidrólisis no enzimática y desplazamiento de grupos oxalato, lo que conduce a la formación de complejos con clorato, glutatión, metionina y cisteína y origina varias especies reactivas transitorias, como el monoquo DACH (1,2-diaminociclohexano) platino $[Pt(H_2O)Cl(DACH)]^+$ y el diaquo DACH platino $[Pt(H_2O)_2Cl(DACH)]^+$, que se unen covalentemente con macromoléculas. No existe evidencia *in vitro* de actividad metabólica mediada por la vía del citocromo P450. La glutathione-S-transferasa (GST) es responsable de la conjugación intracelular del metabolito diaminociclohexano del oxaliplatino $[PtCl_2(DACH)]$ con el glutatión, lo que conduce a la excreción celular del compuesto conjugado $[Pt(DACH)(GSH)_2]$ y la consiguiente inactivación del fármaco antes de que se produzca el daño del ADN⁵⁹⁴. En particular, la subclase π de la enzima GST es de gran importancia en el tejido colorectal y desempeña un papel crucial en el metabolismo del oxaliplatino y otros citotóxicos⁵⁹⁵. La eliminación del fármaco está mediada fundamentalmente por su conjugación extracelular con las proteínas plasmáticas que conlleva la excreción renal de sus metabolitos inactivos.

El principal mecanismo de acción del oxaliplatino consiste en la formación de aductos de ADN, lo que dificulta la progresión de la horquilla de replicación inhibiendo su síntesis y conduciendo a la apoptosis de las células tumorales⁵⁹⁶. El daño en el ADN inducido por el fármaco se puede reparar fundamentalmente por medio de los sistemas de reparación por excisión de nucleótidos o *nucleotide excision repair* (NER),

reparación por excisión de bases o *base excision repair* (BER) o mediante bypass replicativo⁵⁹⁷.

Las principales vías implicadas en el transporte, metabolismo intracelular y eliminación de oxaliplatino se resumen en la Figura 2.

Figura 2: Vías metabólicas del oxaliplatino



La resistencia al oxaliplatino es un proceso multifactorial que puede estar mediado por diversos mecanismos como la alteración de los procesos de captación y flujo de salida del fármaco que conllevan una reducción de su concentración intracelular, el incremento de la detoxificación de su forma activa o en la reparación de los aductos de ADN o un sistema de reconocimiento y reparación del daño del ADN defectuoso. La presencia de variantes polimórficas en cualquiera de estos sistemas puede explicar las diferencias interindividuales en la sensibilidad al oxaliplatino. Los principales estudios farmacogenéticos se han centrado en los genes que codifican los transportadores ABC/SLC, la maquinaria de reparación del daño del ADN y las enzimas de conjugación GST (Tabla 18)⁵⁹

Tabla 18: Polimorfismos comunes en sistemas enzimáticos implicados en la farmacología del oxaliplatino

dbSNPs ID	POLIMORFISMO	ALELOS	REPERCUSIÓN FUNCIONAL
SISTEMA DE REPARACIÓN POR EXCISSION DE NUCLEÓTIDOS (NER)			
rs11615	SNP ERCC1 354 T>C	T>C	SNP sinónimo, reducción de la actividad transcripcional de ERCC1
rs3212948	SNP ERCC1 321+74 C>G	C>G	SNP intrónico (intrón 2), función no caracterizada
rs1799793	SNP ERCC2 862 G>A	G>A	Asp312Asn, menor capacidad de reparación del ADN del alelo Asn que del Asp
rs13181	SNP ERCC2 2251 A>C	A>C	Lys751Gln, el alelo Gln se asocia con menor capacidad de reparación del ADN
rs17655	SNP ERCC5 4672 G>C	G>C	Asp1104His, reducción de la actividad enzimática y de la capacidad de reparar el ADN del alelo His
rs2228001	SNP XPC 2795 A>C	A>C	Lys939Gln, el alelo Gln se asocia con menor capacidad de reparar el ADN
SISTEMA DE REPARACIÓN POR EXCISSION DE BASES (BER)			
rs25487	SNP XRCC1 1196 A>G	A>G	Arg399Gln, el alelo Gln se asocia con menor capacidad de reparación del ADN
SISTEMA DE REPARACIÓN POR RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA (HRR)			
rs3218536	SNP XRCC2 31479 G>A	G>A	Arg188His, el alelo His se asocia a una alteración en el funcionamiento del sistema HRR y menor capacidad de reparar el ADN
rs861539	SNP XRCC3 18067 C>T	C>T	Thr241Met, el alelo Met reduce la capacidad de reparar el ADN y aumenta el nivel de aductos
SISTEMA DE REPARACIÓN DIRECTA			
rs12917	SNP MGMT 250 C>T	C>T	Leu84Phe, el alelo Phe altera la capacidad de inhibir la proliferación celular y reparar ADN
rs2308321	SNP MGMT 427 A>G	A>G	Ile143Val, menor capacidad de reparar el ADN del alelo Val que lle
SISTEMA DE DETOXIFICACIÓN DE LA GUTACIÓN-S-TRANSFERASA (GST)			
rs1695	SNP GSTP1 313 A>G	A>G	Ile105Val, el alelo Val se asocia a menor actividad enzimática
rs1138272	SNP GSTP1 341 C>T	C>T	Ala114Val, el alelo Val se asocia a alteración de la cinética enzimática

5.3.2. Polimorfismos en los genes implicados en los sistemas de reparación del daño del ADN

Como se ha comentado previamente, los aductos en el ADN inducidos por oxaliplatino se reparan fundamentalmente a través de los sistemas enzimáticos NER y BER⁵⁹⁷, por lo que la variabilidad interindividual en la reparación del daño genético por medio de estas vías puede condicionar la eficacia diferencial del tratamiento con este fármaco.

5.3.2.1. Polimorfismos en los genes implicados en el sistema NER

Las proteínas excision repair cross complementing group 1 (ERCC1) y 2 (ERCC2), también conocida como xeroderma pigmentosum group D (XPB), son los dos componentes fundamentales del sistema NER y desempeñan un papel crucial en la regulación de otros elementos de la vía^{597,599}. El sistema NER comprende 30 proteínas implicadas en el reconocimiento del daño en el ADN, su incisión, ensamblaje y resíntesis. El ADN dañado es reconocido por la proteína xeroderma pigmentosum group C (XPC), que recluta al factor de transcripción de iniciación humano TFIIH y a la proteína xeroderma pigmentosum group A (XPA). A continuación, las helicasas xeroderma pigmentosum group B (XPB) y XPD, componentes del complejo TFIIH, separan la hebra defectuosa de la sana y, finalmente, las nucleasas xeroderma pigmentosum group G (XPG) y el heterodímero formado por ERCC1-xeroderma pigmentosum group F (XPF) ejecutan la incisión 3' y 5' de la hebra dañada, respectivamente, lo que conduce a la eliminación de los nucleótidos aberrantes⁶⁰⁰. De lo expuesto se deduce que los SNPs en cualquiera de estos genes pueden condicionar una actividad subóptima de los sistemas enzimáticos que reparan el ADN, modulando así la sensibilidad de las células tumorales a la terapia con platinos.

El efecto de los niveles de expresión de ERCC1 en el pronóstico de los pacientes con CCR tratados con oxaliplatino ha sido evaluado en múltiples estudios, la mayoría de los cuales concluyen que los niveles bajos de mRNA se asocian con un pronóstico favorable debido a una menor capacidad de la enzima para eliminar los aductos en el ADN inducidos por el fármaco⁶⁰¹⁻⁶⁰⁵. Se han descrito varios polimorfismos en este gen, de los que los SNPs rs11615 (354 C>T, Asn118Asn) y rs3212986 (321+74 C>G) son los mejor caracterizados. SNP 354 C>T es un polimorfismo silente y, aunque el mecanismo mediante el cual modifica la actividad de la ERCC1 no está completamente aclarado, se postula que el alelo 354T puede alterar la eficacia del proceso transcripcional, reduciendo los niveles de mRNA y su expresión proteica, por lo que podría asociarse con una respuesta favorable al tratamiento con oxaliplatino⁶⁰⁶.

Múltiples estudios^{41,44,45,477,485,488,492,493,555,585,607,608,609,610-624} y meta-análisis⁶²⁵⁻⁶²⁷ han evaluado el valor pronóstico de este SNP en pacientes con CCR tratados con este fármaco, tanto en el contexto adyuvante^{41,44,45,476,477,610} como en la enfermedad avanzada^{485,488,489,492,493,555,585,607-609,611-630}. Aunque algunos han demostrado que los portadores del genotipo ERCC1 354T/T presentan un pronóstico favorable^{492,607,608,612,619,630}, otros trabajos no han encontrado una asociación significativa^{45,477,488-490,493,614-618,629} o incluso han demostrado un mejor pronóstico en portadores del genotipo C/T-C/C^{44,484,485,555,609-611,613,620,628,630}. Tampoco se ha encontrado una asociación consistente entre las variantes alélicas del SNP 354 C>T y el desarrollo de toxicidad^{44,476,477,485,488,489,493,555,610,612,615-617,621-624,630}.

Respecto al gen ERCC2, los dos polimorfismos estudiados en mayor medida son los SNPs rs1799793 (939 G>A, Asp288Asn) y rs13181 (2251 A>C, Lys751Gln)⁶²⁸. Aunque la asociación del genotipo ERCC2-2251C/C con un riesgo 7 veces superior de reparación subóptima del ADN⁶²⁸ ha llevado a postular que los portadores de alelo A presentan un sistema reparador más eficiente⁶²⁹ y una mayor probabilidad de resistencia al oxaliplatino, los resultados de la práctica clínica no respaldan esta hipótesis⁶³⁰. La mayor parte de los estudios^{485,488,612,615,616,631-634} y tres meta-análisis recientes^{628,629,635} han demostrado que son los portadores del alelo 2252C los que presentan un pronóstico desfavorable, aunque otros trabajos han encontrado la asociación opuesta^{610,636} o no han evidenciado ninguna correlación^{45,477,490,492,493,561,611,617-619,630,637}. El mecanismo por el que este SNP altera la eficacia del oxaliplatino continúa siendo impreciso, habiéndose propuesto la reducción de los niveles de mRNA de XPD o de su actividad proteica como posible explicación.

El gen excision repair cross complementing group 5 (ERCC5) codifica la proteína XPG, otra de las enzimas esenciales en la vía NER. La reducción de su actividad enzimática se correlaciona con una menor capacidad para reparar el daño en el ADN inducido por los platinos y con un aumento de la sensibilidad a estos compuestos⁶³⁸. Respecto al SNP rs17655 (4672G>C, Asp1104His), uno de los más estudiados⁶³⁹⁻⁶⁴¹, un estudio asiático ha demostrado que el genotipo WT G/G se asocia con un pronóstico favorable en pacientes tratados con oxaliplatino adyuvante⁶⁴⁰, mientras que un segundo trabajo en una población similar objetiva que son los portadores de los genotipos C/G-C/C los que presentan una SLE más prolongada⁶⁴¹. En cuanto al SNP rs1047768 (335T>C, His46His)^{619,637,642}, dos estudios recientes concluyen que el alelo mutado 335C confiere un pronóstico favorable^{637,642}. Excision repair cross complementing group 6 (ERCC6) participa en la eliminación de las lesiones inducidas por la RNA polimerasa II

en la hebra de DNA que se transcribe⁶⁴³. Aunque varios polimorfismos en este gen se han relacionado con la susceptibilidad a desarrollar distintos tumores⁶⁴⁴⁻⁶⁴⁶, entre ellos el CCR⁶⁴⁶, su valor pronóstico no se ha establecido hasta la fecha.

Los genes XPA y XPC desempeñan un papel clave en las etapas iniciales del proceso de reparación del ADN mediado por la vía NER (detección de la lesión y reclutamiento del resto de la maquinaria de reparación)⁶⁴⁷. Monzo et al estudiaron el impacto pronóstico del polimorfismo XPA rs1800975 (5'UTR T>C) en pacientes con CCR avanzado tratados con oxaliplatino, objetivando que los portadores de los genotipos XPA T/C-C/C presentaban una supervivencia más prolongada y una mayor toxicidad digestiva⁶³⁷. Sin embargo, esta asociación no ha podido confirmarse por otros grupos⁴⁸⁴. Respecto a XPC, varios autores han demostrado que los polimorfismos en este gen pueden alterar la capacidad de reparación del ADN y modular el riesgo de desarrollar CCR^{641,648,649}. Su asociación con el pronóstico se ha evaluado en tres estudios asiáticos recientes que incluyen pacientes con CCR tratados con oxaliplatino adyuvante^{640,641,650}. En uno de ellos se objetivó una SLE significativamente superior en portadores del SNP rs2228000 (Ala499Val C>T) C/T-C/C⁶⁴¹, pero otros dos trabajos no encontraron asociación entre el SNP rs2228001 (Lys939Gln A>C) y el pronóstico^{640,650}. Finalmente, la proteína codificada por el gen RAD23 forma un complejo con XPC en el proceso de reconocimiento del daño en el ADN⁶⁵¹. Algunos estudios han encontrado una asociación entre el SNP IVS5-15 A>G en este gen y el riesgo de desarrollar diferentes tumores^{652,653}, pero su valor pronóstico en CCR no ha sido evaluado.

5.3.2.2. Polimorfismos en los genes implicados en el sistema BER

El sistema BER se considera fundamental en la reparación de las pequeñas lesiones del ADN generadas por la exposición a agentes ambientales o por procesos metabólicos celulares, como son las roturas de hebra simple, los aductos no voluminosos, el daño oxidativo, la alquilación o la metilación⁶⁵⁴.

El gen X-ray repair cross-complementing group 1 (XRCC1) codifica una de las enzimas más importantes de esta vía, que participa en la reparación del daño en bases específicas inducido por el oxaliplatino⁶⁵⁵. Se ha identificado un SNP relativamente común en este gen, el rs25487 (1196 A>G, Arg399Gln), que media un cambio conformacional en los dominios de interacción con otras proteínas, disminuyendo su capacidad de reparar el ADN⁶⁵⁶. Por lo tanto, cabría esperar que los portadores de la variante polimórfica fueran más sensibles al tratamiento con oxaliplatino y más propensos a desarrollar toxicidad. De acuerdo con esta hipótesis,

varios autores han demostrado que el genotipo 1196G/G se asocia con una mayor tasa de respuestas y una supervivencia más prolongada en pacientes tratados con oxaliplatino adyuvante⁴⁴ o en la enfermedad avanzada^{611,619,636,657}. Sin embargo, otros trabajos y un meta-análisis reciente no han podido confirmar el valor pronóstico de este polimorfismo^{476,484,485,488,490,492,608,612,618,622,630} o incluso han observado resultados contrarios, al ser los pacientes portadores de las variantes 1196 G/A-A/A los que presenta un pronóstico favorable^{562,613,634,658,659,660,661}. Respecto a la toxicidad, Lee et al objetivaron que los pacientes tratados con FOLFOX4 adyuvante con el genotipo 1196G/G presentaban un menor riesgo de desarrollar neuropatía \geq grado 2 que aquellos con el alelo WT 1196A⁴⁷⁷. No se ha encontrado una asociación significativa entre este polimorfismo y el desarrollo de toxicidad en el resto de estudios que han evaluado esta cuestión^{41,476,485,488,494,555}.

5.3.2.3. Polimorfismos en los genes implicados en la vía de reparación por recombinación homóloga (HRR)

La vía HRR está implicada en la reparación de roturas de ADN de doble cadena durante la fase S del ciclo celular, por lo que se considera crucial para mantener la integridad genómica. Su funcionamiento defectuoso juega un papel crítico en la carcinogénesis mediante la disrupción de genes supresores tumorales o activación de proto-oncogenes⁶⁶². Varias proteínas de la familia RAD51 participan en esta vía, entre ellas X-ray repair cross-complementing group 2 (XRCC2) y 3 (XRCC3)⁶⁶³.

Aunque los estudios preclínicos han demostrado una reducción marcada de la actividad HRR en células XRCC2 deficientes⁶⁶⁴, la función exacta de los SNPs de este gen en respuesta al daño celular inducido por diferentes agentes no está completamente aclarada. Uno de los SNPs más frecuentes, el rs3218536 (31479 G>A, Arg188His), se ha relacionado ampliamente con el riesgo de desarrollar distintos tumores⁶⁶⁵⁻⁶⁷⁰, incluido el CCR⁶⁶⁷⁻⁶⁷⁰. Sin embargo, su impacto en el pronóstico de los pacientes tratados con oxaliplatino no se ha establecido en la actualidad.

Respecto al gen XRCC3, estudios preclínicos han demostrado que las líneas celulares XRCC3 deficientes presentan una actividad HRR reducida y son hipersensibles a radiaciones ionizantes y UV, agentes alquilantes y otros fármacos⁶⁷¹. Varios autores han evaluado el valor pronóstico del principal SNP en este gen (rs861539, 18067 C>T, Thr241Met) en pacientes con CCR tratados con oxaliplatino. Algunos concluyen que el genotipo 18067 T/T confiere un pronóstico favorable⁶¹⁹, mientras que otros no demuestran una asociación significativa^{485,634} o encuentran resultados opuestos⁶⁶⁰. El

SNP rs1799794 también se ha relacionado con una mayor incidencia de toxicidad no hematológica \geq grado 3 en un estudio reciente en el contexto adyuvante⁴¹.

5.3.2.4. Polimorfismos en metilguanina metiltransferasa (MGMT)

MGMT es una enzima reparadora del ADN que protege a las células del efecto carcinogénico de los agentes alquilantes endógenos o exógenos mediante la eliminación directa de los aductos alquil o metilo de la posición O₆ de la guanina^{672,673}. Los errores en este proceso conllevan el emparejamiento erróneo de la O₆-metilguanina con la timina durante la replicación del DNA, desempeñando un papel crítico en la transformación neoplásica⁶⁷³⁻⁶⁷⁵. La pérdida de expresión de MGMT es un evento frecuente en muchos tumores, entre ellos el 30-40% de los CCR esporádico⁶⁷⁴⁻⁶⁷⁷. El mecanismo fundamental de inactivación del gen MGMT es la metilación de las islas CpG en la región promotora, lo que conlleva su silenciamiento transcripcional⁶⁷⁸. Tiende a asociarse con una mayor incidencia de mutaciones en los genes RAS^{679,680} y p53^{681,682}, mientras que su relación con el estatus MSS es controvertida^{683,684}. Se ha detectado metilación de MGMT en adenomas⁶⁸⁵ y pólipos serrados^{686,687}, así como en la mucosa colónica sana de pacientes con CCR MGMT-metilado⁶⁸⁸⁻⁶⁹⁰, lo cual sugiere que puede ser un evento precoz en la carcinogénesis colorectal^{683,691}. Además, la inactivación epigenética de MGMT ha demostrado ser un marcador predictivo de respuesta a la terapia con agentes alquilantes^{692,693}.

Se han descrito varios SNPs funcionales en la región promotora del gen MGMT. Los más comunes, el rs12917 (c.250C>T, p.Leu84Phe), rs2308327 (c.533A>G, p.Lys178Arg), rs2308321 (c.427A>G, p.Ile143Val) y rs16906252 (C.-56C>T), se asocian con un incremento del riesgo de varios tumores, incluyendo el CCR⁶⁹⁴⁻⁶⁹⁷, y con la metilación del promotor de MGMT en el caso de rs16906252^{678,688}. Respecto a su valor pronóstico, dos estudios han demostrado una supervivencia favorable en pacientes con CCR avanzado tratados con QT basada en oxaliplatino portadores de los genotipos G/G-G/T en el SNP rs1625649 (-535G>T)⁶⁹⁸ y T/T en el SNP rs12917⁶¹⁹.

5.3.3. Polimorfismos en los genes implicados en el sistema de detoxificación de la glutatión-S-transferasas (GSTs)

Las GSTs pertenecen a una superfamilia de enzimas diméricas implicadas en las reacciones metabólicas de fase II⁶⁹⁹. Están codificadas por genes pertenecientes a al menos cinco grupos principales, α (GSTA1), μ (GSTM1), π (GSTP1), σ (GSTS1) y θ

(GSTT1), muchos de los cuales presentan polimorfismos que pueden modular la transcripción y/o actividad enzimática de las correspondientes proteínas⁷⁰⁰.

Una de las isoenzimas de esta familia, la GSTP1, se encuentra altamente expresada en tumores colorectales humanos y participa en la detoxificación de los platinos mediante su conjugación con el glutatión, modulando así la resistencia a estos fármacos⁷⁰¹. La expresión elevada de GSTP1 se asocia con características histológicas desfavorables⁷⁰² y con un pronóstico adverso en muchos tumores, incluido el CCR^{702,703}. Los dos polimorfismos más comunes en este gen, rs1695 (313 A>G, Ile105Val) y rs1138272 (341 C>T, Ala114Val), conllevan un cambio de aminoácido en el sitio activo de unión a los compuestos electrofílicos (Tabla 18)⁷⁰⁴. Se ha demostrado que el SNP 313 A>G condiciona una reducción de la actividad enzimática de GSTP1 y una menor capacidad de inactivar el oxaliplatino, por lo que podría contribuir a incrementar la sensibilidad al fármaco⁷⁰⁵. Algunos estudios han demostrado que los pacientes con CCR portadores del genotipo 313 G/G se benefician en mayor medida del tratamiento con oxaliplatino que aquellos con el alelo 313A^{477,484,488,490,610,615,616,706-708}. Sin embargo, otros trabajos^{44,45,476,485,493,608,611,617,618,624,630,632,634,709-711} y una revisión sistemática de 5 estudios⁶⁵⁸ no han confirmado el valor pronóstico de este SNP.

En cuanto a la toxicidad asociada a oxaliplatino, se ha postulado que la menor actividad catabólica de GSTP1 en portadores del genotipo 313 G/G conlleva un incremento de la acumulación del fármaco y un mayor riesgo de toxicidad severa^{485,615,705}. Sin embargo, los resultados de los estudios que han evaluado este aspecto no son concluyentes⁴⁸⁹. Los trabajos iniciales demostraron que los pacientes portadores del genotipo G/G tratados con oxaliplatino presentaban un mayor riesgo de neurotoxicidad severa^{41,485,489,615,616}, pero otros autores observaron una incidencia de neuropatía superior en los portadores del genotipo 313 A/A^{612,623,712} o no encontraron una asociación relevante entre las distintas variantes y la toxicidad neurológica^{476,477,488,493,494,617,624,709,713}. Un meta-análisis reciente de 12 estudios prospectivos que incluyen 2191 pacientes tampoco ha podido confirmar el papel de este polimorfismo en la predicción de la neurotoxicidad inducida por el fármaco⁷¹⁴.

Los resultados no concluyentes de estos estudios pueden explicarse por la presencia de factores de confusión como las diferencias étnicas en la frecuencia de los distintos alelos y genotipos, factores ambientales como la dieta o el hábito tabáquico o el enmascaramiento del efecto de una variante debido a su potencial asociación con otros polimorfismos. La Tabla 19 resume los principales estudios farmacogenómicos en pacientes con CCR tratados con QT adyuvante basada en oxaliplatino.

Tabla 19: Principales estudios farmacogenómicos de polimorfismos en genes implicados en los sistemas de reparación del ADN y detoxificación de GSTs en pacientes con CCR tratados con QT adyuvante basada en oxaliplatino

ESTUDIO (AÑO)	Nº PACIENTES/ TRATAMIENTO	SNP ESTUDIADOS	ASOCIACIÓN CON PRONÓSTICO/TOXICIDAD
Ruzzo A (2014) ⁴⁷⁶	517 pacientes estadio II-III FOLFOX4/CAPOX adyuvante	ERCC1 rs11615, ERCC2 rs13181 y rs1799793, XRCC1 rs25487, XRCC3 rs861539, GSTP1 rs1695, GSTT1 +/-, GSTM1 +/-	No asociación de ninguno de los polimorfismos con el desarrollo de toxicidad
Zaanan A (2014) ⁴⁴	210 pacientes estadios II-III FOLFOX adyuvante	ERCC1 rs11615, XRCC1 rs25487, GSTP1 rs1695	Los genotipos ERCC1 C/T-T/T y XRCC1 A/A se asocian a una SLE superior
Kap EJ (2014) ⁷⁰⁷	755 pacientes estadios II-IV QT adyuvante/paliativa basada en oxaliplatino	GSTP1 rs1695, GSTT1 +/-, GSTM1 +/-	El genotipo GSTM1 +/- se asocia con peor SG. Los SNPs GSTP1 rs1695 y GSTT1 +/- no tienen valor pronóstico
Cecchin E (2013) ⁴¹	154 pacientes estadio II-III FOLFOX4 adyuvante	57 SNP en 29 genes relacionados con la reparación del ADN, el daño oxidativo y el transporte celular	Los SNPs GSTP1 rs947894 y rs1138272 se asocian con mayor toxicidad neurológica, XRCC3 rs1799794 con mayor toxicidad no hematológica grado ≥3 y GSTM1 +/- con neutropenia severa
Yue AM (2013) ⁶⁵⁰	428 pacientes estadio I-IV 5-FU/LV, FOLFOX o CAPOX	XPC rs2228001	No asociación XPC rs2228001 con la SLE/SG
Lee KH (2013) ⁴⁷⁷	292 pacientes estadio II-III FOLFOX adyuvante	20 SNPs en 10 genes (TS, MTHFR, ERCC1, XPD, XRCC1, ABCC2, AGXT, GSTP1, GSTT1, GSTM1)	No asociación SNPs con pronóstico. ERCC1 11615 T/T y XRCC1 23885 A/A-A/G predicen mayor riesgo de neutropenia y neuropatía G3-4, respectivamente
Lai CY (2013) ⁶³⁴	491 pacientes estadio II-II QT adyuvante con fluoropirimidinas	ERCC2 rs13181, XRCC1 rs25487, XRCC3 rs861539, GSTP1 rs1695, GSTT1 +/-, GSTM1 +/-	ERCC2 A/C-C/C y XRCC1 A/G-G/G se asocian a un mayor riesgo de recidiva
Li HY (2012) ⁶¹⁰	335 pacientes estadio I-IV FOLFOX6	ERCC1 rs11615, ERCC2 rs13181, GSTP1 rs1695	ERCC1 C/C, ERCC2 G/G y GSTP1 G/G se asocian a una supervivencia más favorable
Liu D (2012) ⁶⁴⁰	1028 pacientes estadio II-III QT adyuvante basada en oxaliplatino	ERCC5 rs17655 y XPC rs2228001	ERCC5 G/G se asocia con una SLE más prolongada que los genotipos G/C-C/C
Fariña-Sarasqueta A (2011) ⁴⁵	98 pacientes estadio III QT adyuvante basada en oxaliplatino	ERCC1 rs11615, ERCC2 rs13181, GSTP1 rs1695	Ninguno de los SNPs tiene valor pronóstico en la población global. GSTP1 A/A se asocia a peor supervivencia en varones
Jun L (2009) ⁷⁰⁷	122 pacientes estadio III-IV QT basada en FU-oxaliplatino	GSTP1 rs1695	GSTP1 G/G se asocia con una SG más prolongada que los genotipos A/G-A/A

5.4. POLIMORFISMOS EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGFR)

5.4.1. Polimorfismos en el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y EGFR

La activación de EGFR pone en marcha una serie de vías de señalización intracelular que regulan procesos claves en la carcinogénesis como la proliferación, la angiogénesis tumoral, la apoptosis o el ciclo celular⁷¹⁵. Se encuentra sobreexpresado en numerosas neoplasias epiteliales, entre ellas el 80% de los CCR, en las que ha demostrado ser un factor pronóstico adverso asociado a un comportamiento más agresivo y a un mayor riesgo de invasión y metástasis⁷¹⁶⁻⁷¹⁸. En consecuencia, la regulación estrecha de los distintos componentes de la vía puede modular el efecto no sólo de los inhibidores de EGFR, sino también de los agentes citotóxicos tradicionales.

Se han descrito varios polimorfismos funcionales tanto en EGFR como en su ligando EGF. El gen EGFR contiene una secuencia altamente polimórfica en el intrón 1 consistente en un VNTR de dinucleótidos CA (9-23 repeticiones CA)^{719,720}. La longitud de este (CA)_n polimorfismo se correlaciona de forma inversa con la actividad transcripcional del gen, presentando los tumores con la variante corta (16 repeticiones) niveles de expresión de EGFR superiores que aquellos con la variante larga (>20 repeticiones)⁷²⁰, lo cual conlleva mayor actividad proliferativa⁷¹⁹, y, en algunos trabajos, mayor beneficio del tratamiento con inhibidores de EGFR^{721,722}. La mayor parte de los estudios que han evaluado su valor pronóstico en pacientes tratados con QT basada en fluoropirimidinas y oxaliplatino⁷²³⁻⁷²⁸ han demostrado una mayor tasa de respuestas y una supervivencia favorable en portadores de la variante larga (L/L)^{723-726,728}.

También se han identificado dos SNPs exónicos relevantes. El primero de ellos, rs2227983 (61G>A, Arg497Lys), localizado en el dominio extracelular, conlleva una menor afinidad por sus ligandos, así como una disminución de la activación tirosinquinasa e inducción de proto-oncogenes (myc, fos y jun)⁷²⁹, lo cual explica el pronóstico favorable que confiere el alelo 497A en la mayoría de los trabajos publicados^{723,724,726,730,731}. Un segundo SNP, el rs712830 (-216G>T), se localiza en la región promotora del gen y su alelo mutado T implica una mayor actividad enzimática⁷³² y un incremento del 40% en la expresión proteica de EGFR en relación con el alelo G⁷³³. Dos estudios que han analizado su impacto pronóstico en pacientes con CCR han obtenido resultados discordantes^{723,734}.

En cuanto a los polimorfismos en EGF, el mejor caracterizado es el SNP rs4444903 (+61A>G). Consiste en la sustitución de una adenina por una guanina en la región

5'-UTR del gen, lo cual implica un aumento de los niveles de expresión de EGF⁷³⁵. Varios estudios han relacionado esta variante con el pronóstico de los pacientes tratados con inhibidores de EGFR, pero los resultados respecto a cuáles son los genotipos favorables divergen de unos a otros^{721,736}. Respecto a la QT, dos trabajos recientemente publicados han demostrado que los portadores del alelo mutado 61G tratados con combinaciones de oxaliplatino y fluoropirimidinas presentan un pronóstico favorable^{614,731}, aunque otros autores no han confirmado estos hallazgos^{727,728}.

Los principales estudios acerca de los polimorfismos implicados en la vía de EGFR se resumen en la Tabla 20.

5.4.2. Polimorfismos en la vía de señalización PI3K-AKT-mTOR

La unión de EGF a su receptor activa la vía PI3K/AKT/mTOR, la cual regula múltiples procesos celulares como la proliferación, la diferenciación y la angiogénesis⁷³⁷. Por tanto, parece razonable plantear que los polimorfismos de los genes implicados en esta vía pudieran condicionar el riesgo de desarrollar distintas neoplasias y su pronóstico.

AKT se encuentra constitutivamente activado en varios tumores en los que promueve la supervivencia celular bloqueando la inducción de la apoptosis⁷³⁸. Se han descrito polimorfismos en AKT1 y AKT2 asociados a un aumento de su expresión proteica, con capacidad de modular el riesgo de CCR⁷³⁹ y de predecir la respuesta al tratamiento y la supervivencia en cáncer de pulmón⁷⁴⁰, vejiga⁷⁴¹ o esófago⁷⁴², entre otros. Sin embargo, en un estudio asiático reciente llevado a cabo en 444 pacientes con CCR resecado no se ha confirmado el valor pronóstico de ninguno de los 14 polimorfismos de la vía PI3K/AKT/mTOR (4 SNPs en AKT1 y 2 en AKT2) analizados⁷⁴³.

En cuanto a mTOR, las variantes polimórficas más estudiadas son rs2295080 T>G en la región promotora, rs2536 en la región 3'-UTR y rs17036508 T>C en localizaciones potenciales de splicing⁷⁴⁴. El SNP rs2295080 regula la actividad transcripcional del gen, asociándose el genotipo T/T con unos niveles de mRNA elevados⁷⁴⁵, mientras que el rs2536 modula la actividad del sitio de unión de los miRNA⁷⁴⁶. Múltiples estudios caso-control^{742,745-748} y un meta-análisis reciente⁷⁴⁴ han demostrado que distintos polimorfismos de mTOR se asocian con la susceptibilidad a desarrollar distintos tumores y con el pronóstico de los mismos. Sin embargo, su impacto pronóstico en CCR no ha podido establecerse hasta la fecha.

Tabla 20: Principales estudios farmacogenómicos de polimorfismos en genes implicados en la vía de señalización de EGFR

ESTUDIO (AÑO)	Nº PACIENTES/ TRATAMIENTO	SNP ESTUDIADOS	ASOCIACIÓN CON PRONÓSTICO/TOXICIDAD
Lai CY (2013) ⁷²³	499 pacientes estadio II-IV QT basada en 5-FU	EGFR intrón 1 (CA) _n , 61 G>A y -216 G>T	Los genotipos (CA) _n larga/larga, 61 G>A A/A y -216 G>T T/T se asocian a una SG superior
Gerger A (2011) ⁷³¹	132 pacientes estadio IV 1ª línea FOLFOX/CAPOX+ Bevacizumab	EGFR 61 G>A y EGF+61 A>G	El alelo 61 G>A se asocia a mayor tasa de respuesta y el EGF +61 A>G a una SG superior
Spinder KL (2010) ⁶¹⁴	68 pacientes estadio IV 1ª línea CAPOX	EGF+61 A>G	El genotipo EGF A/G se asocia a una tasa de respuestas y supervivencia libre de progresión (SLP) favorables
Pander J (2010) ⁷²⁸	246 pacientes estadio IV 1ª línea QT+bevacizumab +/- cetuximab	EGFR intrón 1 (CA) _n y EGF+61 A>G	El alelo (CA) _n corto (<20 repeticiones) se asocia con una SLP desfavorable
Press OA (2008) ⁷²⁴	318 pacientes estadio IV QT con 5-FU +/- oxaliplatino +/- irinotecán	EGFR intrón 1 (CA) _n y EGFR 61 G>A	Varones: SG favorable con 61A/A y (CA) _n ≥20 Mujeres: SG favorable con 61G/G y (CA) _n <20
Lurje G (2008) ⁷²⁷	105 pacientes estadio III QT adyuvante basada en 5-FU	EGFR intrón 1 (CA) _n y 61 G>A, EGF +61 A>G	No valor pronóstico
Wang WS (2007) ⁷³⁰	209 pacientes estadio II-IV QT adyuvante/1ª línea 5-FU-oxaliplatino	EGFR 61 G>A	El alelo 61A se asocia a una SLE y SG favorable en estadios II-III y una tasa de respuestas y SG favorable en estadios IV
Spindler KL (2006) ⁷³⁴	77 pacientes cáncer de recto T3 Radioterapia+fluoropirimidinas neoadyuvante	EGFR -216 G>T	El genotipo G/G se asocia a menor porcentaje de pacientes con regresión tumoral (TRG) 1-2
Zhang W (2005) ⁷²⁵	105 pacientes estadio IV QT con fluoropirimidinas y oxaliplatino	EGFR intrón 1 (CA) _n y 61 G>A	El alelo (CA) _n corto (<20 repeticiones) se asocia con una SLP desfavorable
Zhang W (2005) ⁷²⁶	59 pacientes ca de recto Quimioradioterapia con fluoropirimidinas	EGFR intrón 1 (CA) _n y 61 G>A	Los genotipos (CA) _n corto/corto (<20 repeticiones) 61 G/G se asocian a un mayor riesgo de recaída

5.5. POLIMORFISMOS EN GENES RELACIONADOS CON LA ANGIOGÉNESIS

La angiogénesis, formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los precursores endoteliales, es un requisito universal para el crecimiento y progresión de los tumores sólidos^{749,750}. Puesto que el microambiente tumoral desempeña un papel clave en este proceso y depende en gran medida de la respuesta del huésped, la farmacogenética de los genes implicados en el mismo es una aproximación prometedora para intentar explicar la variabilidad interindividual en el pronóstico y la respuesta a la QT o los fármacos antiangiogénicos.

5.5.1. Angiogénesis dependiente del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)

VEGF-A y sus receptores VEGFR-1 (FLT-1) y VEGFR-2 (KDR) regulan la angiogénesis fisiológica y patológica y están íntimamente implicados en otras funciones fundamentales para el desarrollo y la progresión tumoral como la inducción de la migración de las células endoteliales, el aumento de la permeabilidad vascular, la inhibición de la apoptosis de las células endoteliales o la maduración de las células dendríticas^{751,752}. Múltiples estudios preclínicos y clínicos han demostrado que la sobreexpresión de VEGF se asocia con un mayor riesgo de metástasis y un pronóstico desfavorable en varios neoplasias humanas, entre ellas el CCR^{753,754}.

VEGF-A es un gen altamente polimórfico y se han descrito varios SNPs en la región promotora (-2578 C>A, -460 C>T) y en las regiones 5' (+405 G>C, -1154 G>A) y 3'-UTR (+936 C>T)^{755,756}. Su asociación con la actividad promotora y con los niveles de expresión de VEGF se ha demostrado en varios trabajos⁷⁵⁷, así como su correlación con un mayor riesgo de desarrollar distintas neoplasias, entre ellas el CCR, y con su pronóstico^{755,756,758,759}. Además, pueden modificar la estructura y función de los vasos sanguíneos, lo que condiciona la liberación de QT en el tumor y la respuesta a los fármacos⁷⁶⁰. En CCR, múltiples estudios farmacogenéticos han evaluado la asociación entre estos SNPs y la supervivencia de los pacientes tanto en el contexto adyuvante^{727,761-771} como en la enfermedad avanzada^{731,735,756,769-784}. Aunque algunos han demostrado el valor pronóstico de los mismos, los resultados de los distintos trabajos son no concluyentes o incluso contradictorios (Tabla 21).

En cuanto a los receptores de VEGF, se ha demostrado que la sobreexpresión de VEGFR-1 y fundamentalmente de VEGFR-2 conlleva un aumento del riesgo de

CCR⁷⁸⁵, una menor respuesta al tratamiento y una supervivencia desfavorable⁷⁸⁶. Se han estudiado varios SNPs en estos genes, principalmente FLT-1 2795 A>C, KDR -604 T>C y KDR -5578 A>G. Aunque algunos trabajos han encontrado una asociación significativa entre las distintas variantes y el pronóstico de los pacientes^{731,763,766,769,771,776,784}, otros autores no han podido reproducir estos resultados (Tabla 21)^{727,773,774}.

5.5.2. Angiogénesis VEGF-independiente

La interleuquina 8 (IL-8) es un miembro de la familia de quemoquinas CXC con propiedades antiangiogénicas que ejerce a través de la interacción con sus receptores CXCR-1 y CXCR-2^{787,788}. La inducción de IL-8 mantiene la respuesta antiangiogénica en las células de CCR deficientes en factor inducible por hipoxia (HIF)-1 α , lo cual sugiere que desempeña un papel crítico en la angiogénesis tumoral independiente de VEGF⁷⁸⁹. Su sobreexpresión se asocia con un pronóstico desfavorable y un mayor riesgo de recurrencia en varias neoplasias. Se ha identificado un SNP común en IL-8 (-251 T>A) que conlleva un incremento de sus niveles plasmáticos en modelos *in vivo*⁷⁹⁰. Algunos trabajos han encontrado una asociación significativa de este polimorfismo^{727,783,784} y los de CXCR-1 (+2607G>C) y CXCR-2 (+785 C>T)^{725,730} con la supervivencia de los pacientes con CCR, pero otros estudios no han confirmado su valor pronóstico (Tabla 21)^{735,768}.

La IL-1 β y el receptor antagonista de la IL-1 (IL-1RN) son otras citoquinas proinflamatorias presentes en células inmunes activadas y células tumorales, que contribuyen a la respuesta proangiogénica independiente de VEGF mediante la activación del VEGF-A endotelial y la IL-8⁷⁹¹. Se han descrito varios SNPs en IL-1 β (+3954 C>T, -511 C>T)⁷⁹²⁻⁷⁹⁴ e IL-1RN (+2018 T>C, VNTR)^{793,795} que modulan los niveles plasmáticos de las respectivas proteínas y se asocian con el riesgo de desarrollar distintos tumores. Un estudio reciente llevado a cabo en pacientes con CC estadio II tratados con QT adyuvante basada en 5-FU ha demostrado que los portadores del genotipo T/T de IL-1 β +3954 C>T y de alelos con ≥ 4 repeticiones del IL1RN VNRT presentan un mayor riesgo de recidiva (Tabla 21)⁷⁶⁸.

Finalmente, la angiopoietina-1 (ANGPT1) es otro de los mediadores claves de la angiogénesis VEGF-independiente, que actúa promoviendo la estabilidad y disminuyendo la permeabilidad de los vasos sanguíneos⁷⁹⁶. Se ha identificado un SNP (949 G>C) en la región 3'-UTR del gen ANGPT1 asociado a una SG favorable en pacientes asiáticos con CCR resecado tratados con el esquema FOLFOX⁷⁹⁷.

Tabla 21: Principales estudios farmacogenómicos de polimorfismos en genes relacionados con la angiogénesis en pacientes con CCR tratados con QT adyuvante

ESTUDIO (AÑO)	Nº PACIENTES/ TRATAMIENTO	SNP ESTUDIADOS	ASOCIACIÓN CON PRONÓSTICO/TOXICIDAD
Kjaer-Frifeldt S (2012) ⁷⁶²	698 pacientes estadio II	VEGFA rs699947, rs833061 y rs2010963	rs699947 A/A y rs833061 T/T se asocian con un tiempo hasta la recaída inferior
Dong G (2012) ⁷⁶³	418 pacientes estadios II-IV resecados 78,2% 5-FU/FOLFOX adyuvante	KDR rs100113228, rs2071559, rs2305948 y rs 1870377	Los alelos rs100113228 G y rs2071559 C se asocian a un menor riesgo de recidiva
Dai J (2012) ⁷⁹⁷	408 pacientes estadio II-IV resecados 78,2% QT adyuvante	ANGPT1 rs1954227 y rs9297395, AMOT rs2286064, rs2286063 y rs640009, DLL4 rs12439845 y ENG rs7865146	ANGPT1 rs1954727 C/C se asocia con una SG superior
Hansen TF (2010) ⁷⁶⁴	486 pacientes estadio II-III resecados 18% 5-FU adyuvante	VEGFA rs699947, rs833061, rs2010963	rs699947 C/A, rs833061 C/T, rs2010963 G/C se asocian con una SLE y SG desfavorable
Hansen TF (2010) ⁷⁶⁶	292 pacientes estadio II-IV resecados	KDR rs2071559 y rs2305948	rs2071559 T/T-T/C y rs2305948 C/C se asocian a una SLE favorable
Vidaurreta M (2010) ⁷⁶⁷	177 pacientes estadio II-III 75% 5-FU/LV adyuvante	VEGFA rs699947, rs1570377, rs3025039	rs3025039 T/T se asocia a una SG superior
Dassoulas K (2009) ⁷⁶⁵	312 pacientes CCR resecado	VEGFA rs699947, rs2010963, rs1570377, rs3025039 y rs833061	rs699947 A/A, rs2010963 C/C y rs3025039 T/T se asocian con una SG inferior
Lurje G (2009) ⁷⁶⁸	109 pacientes estadio II 5-FU +/- oxaliplatino adyuvante	VEGFA rs3025039 y rs2010963, VEGFR2 rs1870377, IL-8 rs4073, IL-1β rs16944 y rs1143634, IL-1RN rs2234663	VEGFR2 rs2010963 G, IL-1β rs1143634 C y IL-1RN rs2234663 2/2 se asocian con SLE desfavorable
Lurje G (2008) ⁷²⁷	105 pacientes estadio III QT adyuvante basada en 5-FU	VEGFA rs3025039 y rs2010963, IL-8 rs4073, CXCR1 rs2234671, CXCR2 rs2230054	rs4073 T y rs3025039 T se asocian con una SLE superior
Kim J (2008) ⁷⁶¹	445 pacientes estadio I-IV resecados 91% fluoropirimidinas adyuvante	VEGFA rs699947, rs2010963, rs3025039	rs2010963 C y rs3025039 C se asocian con una SG superior

5.6. POLIMORFISMOS EN GENES IMPLICADOS EN EL METABOLISMO Y TRANSPORTE DE FÁRMACOS

La actividad antitumoral de los agentes quimioterápicos se relaciona directamente con su acumulación en las células dianas, la cual está regulada por la captación y salida de los fármacos a través de las membranas celulares. Por lo tanto, los transportadores de membrana son uno de los principales determinantes de la sensibilidad a los mismos⁷⁹⁸. Entre las proteínas relevantes en la captación y acumulación intracelular de los derivados de platino se encuentran las proteínas transportadoras de cobre (CTR)^{590-592,799} y los transportadores de cationes orgánicos (OCTs) pertenecientes a la familia SLC22⁸⁰⁰. Además, existen otros transportadores implicados en la excreción de estos compuestos al exterior celular, entre los que destacan los transportadores multifármacos dependientes de ATP (superfamilia de transportadores ABC) y las ATPasas tipo P transportadoras de cobre^{593,798,801}.

Numerosos estudios han demostrado que la eficacia del oxaliplatino se asocia con los niveles de expresión de los transportadores de membrana tanto en las células tumorales como en el tejido sano adyacente^{590,802,803}. También se ha evaluado el valor pronóstico de distintas variantes polimórficas en este contexto, centrándose la mayor parte de los estudios en la superfamilia de transportadores ABC⁸⁰⁴. Esta familia, constituida por 49 miembros agrupados en 7 subfamilias (ABCA a ABCG), está implicada en la excreción de una gran variedad de sustratos endógenos, xenobióticos y agentes quimioterápicos, por lo que juega un papel crítico en la aparición de resistencias⁸⁰⁵. Se han estudiado numerosos polimorfismos en estos genes, fundamentalmente en ABCB1, ABCG2 y la subfamilia ABCC, su repercusión funcional en la expresión proteica, la especificidad por sus sustratos o la actividad transportadora, así como su asociación con la susceptibilidad a desarrollar distintos tumores y el pronóstico de los pacientes tratados con derivados de platino^{439,804}.

El gen ABCB1 o MDR1 (multidrug resistance gene), codifica la glicoproteína P (P-gp), que se localiza en la superficie luminal de las células del epitelio intestinal a las que protege de las toxinas endógenas y exógenas⁸⁰⁴. Se han identificado más de 50 polimorfismos en la región codificante del gen. Los más comunes son los SNPs sinónimos 1236 C>T y 3435 C>T y el no sinónimo 2677 G>T/A (Tabla 22), que se han relacionado con una expresión y actividad variable de la P-gp^{806,807} y con el riesgo de desarrollar CCR⁸⁰⁸⁻⁸¹², aunque los datos disponibles no son concluyentes. En cuanto a su valor pronóstico en pacientes con CCR tratados con oxaliplatino, aunque algunos estudios han demostrado que los portadores de los genotipos 1236 C/T-T/T^{813,814} y

3435 C/T-C/C^{650,812} presentan una supervivencia favorable, otros trabajos no han podido confirmar estos hallazgos^{41,476,489} (Tabla 23).

ABCC1/2 o MRP1/2 (multidrug resistance-related proteins) juegan un papel esencial en la excreción de aniones orgánicos como metabolitos fisiológicos, carcinógenos y varios fármacos, entre los que se incluyen algunos citostáticos. Mientras que la expresión de ABCC1 es ubicua, ABCC2 se expresa fundamentalmente en hepatocitos, túbulo renal, intestino y cerebro⁸¹⁵. Cecchin et al han identificado cinco SNPs en ABCC1 (2293-30 G>C) y ABCC2 (3972 C>T, +5591 G>A, 3258+56 C>T y -24 C>T) relacionados con la neuropatía grado 2-3 en pacientes con CCR estadios II-III tratados con FOLFOX4 adyuvante⁴¹. Se ha demostrado que ABCC2 media la excreción tanto del glutatión, necesario para la detoxificación de oxaliplatino vía conjugación, como de los conjugados oxaliplatino-glutatión, lo cual explicaría cómo los SNPs que incrementan la expresión de ABCC2 pueden modular la eficacia o toxicidad de este fármaco⁸¹⁶. Sin embargo, otros estudios no han encontrado asociación entre estos polimorfismos y el pronóstico⁴⁸⁹ o los eventos adversos^{476,489,817} (Tabla 23).

ABCG2 o BRCP (breast cancer resistance protein) se expresa en los hepatocitos, el epitelio intestinal, los pulmones, el riñón y el sistema nervioso central. Excreta activamente una gran variedad de compuestos químicos hidrofóbicos y es uno de los principales mediadores de la resistencia a múltiples fármacos en humanos⁸¹⁸. Se han identificado más de 80 polimorfismos en este gen (Tabla 22), algunos de los cuales afectan a la expresión y función proteica⁸¹⁹ y se asocian con la susceptibilidad a desarrollar distintas neoplasias^{820,821} y con la eficacia o toxicidad de algunos agentes, como el topotecán⁸²² o los inhibidores tirosin-quinasa de EGFR⁸²³. En CCR, se ha encontrado una correlación inversa entre la expresión de ABCG2 y la respuesta al oxaliplatino⁸²⁴⁻⁸²⁶. Sin embargo, el impacto de los SNPs de este gen en el pronóstico o la predicción de toxicidad no se ha establecido en la actualidad^{41,489}.

Finalmente, las sulfotransferasas (SULTs) son enzimas implicadas en las reacciones metabólicas de fase II que median la sulfoconjugación de varios sustratos, entre los que se encuentran algunas hormonas y xenobióticos, facilitando así su excreción⁸²⁷. Se han identificado SNPs en la mayoría de las SULTs humanas, siendo más comunes en la isoforma SULT1A1^{828,829}. Algunos de estos SNPs pueden alterar el fenotipo de las correspondientes proteínas⁸²⁹, y se han relacionado con la susceptibilidad a desarrollar varias neoplasias, entre ellas el CCR^{830,831}, y con la respuesta al tratamiento en cáncer de mama⁸³² y otros tumores hormono-dependientes⁸³³. Sin embargo, su valor pronóstico en CCR no se ha evaluado hasta la fecha.

Tabla 22: Polimorfismos comunes en genes de la superfamilia de transportadores ABC

dbSNPs ID	POLIMORFISMO	ALELOS	REPERCUSIÓN FUNCIONAL	
ABCB1 o MDR1				
rs1045642	SNP ABCB1 3435 C>T	C>T	Polimorfismo sinónimo (Ile1145Ile). El genotipo T/T se asocia a menores niveles de expresión de ABCB1 intestinal y especificidad por los sustratos alterada	
rs1128503	SNP ABCB1 1236 C>T	C>T	Polimorfismo sinónimo (Gly412Gly). El genotipo T/T afecta al plegamiento de aminoácidos cercanos, alterando la especificidad por los sustratos	
rs2032582	SNP ABCB1 2677 G>T/A	G> T/A	Ser893Ala/Thr. El genotipo G/G se asocia con niveles de expresión de ABCB1 altos	
ABCC1/2 o MRP1/2				
rs41395947	SNP ABCC1 128 G>C	G>C	Cys543Ser. El alelo C reduce la localización de ABCC1 en la membrana plasmática	
rs60782127	SNP ABCC1 1299 G>T	G>T	Arg433Ser. El alelo T altera la capacidad de transporte de ABCC1	
rs45511401	SNP ABCC1 2012 G>T	G>T	Gly671Val. Repercusión funcional no conocida	
rs8187710	SNP ABCC2 4544 G>A	G>A	Cys1515Tyr. El alelo A aumenta la expresión hepática de ABCC2 y la biodisponibilidad intracelular de algunos fármacos	
rs717620	SNP ABCC2 -24 C>T	C>T	Polimorfismo en la región promotora. El alelo T reduce los niveles de mRNA y la actividad de ABCC2	
rs2273697	SNP ABCC2 1249 G>A	T>A	Val417Ile. El alelo A reduce la expresión de ABCC2 y altera su localización	
ABCG2 o BRCP				
rs2231137	SNP ABCG2 34 G>A	G>A	Val12Met. El alelo A altera la capacidad de transporte de ABCG2	
rs72552713	SNP ABCG2 376 C>T	C>T	Gln126Stop. El alelo T reduce la capacidad de transporte de ABCG2	
rs2231142	SNP ABCG2 421 C>A	C>A	Gln141Lys. El alelo A afecta al dominio de unión al ATP, reduciendo su capacidad de transporte	
rs34783571	SNP ABCG2 1858 G>A	G>A	Asp620Asn. El alelo A disminuye la expresión de ABCG2 y su actividad <i>in vitro</i>	

Tabla 23: Principales estudios farmacogenómicos de polimorfismos en genes de la superfamilia de transportadores ABC

ESTUDIO (AÑO)	NºPACIENTES/ TRATAMIENTO	SNP ESTUDIADOS	ASOCIACIÓN CON PRONÓSTICO/TOXICIDAD
Ruzzo A (2014) ⁴⁷⁶	517 pacientes estadio II-III FOLFOX4/CAPOX adyuvante	ABCC1 rs2074087 y rs3740066, ABCC1 rs1885301 y rs4148386	No asociación de ninguno de los polimorfismos con el desarrollo de toxicidad
Wu H (2013) ⁸¹³	1028 pacientes estadio II-III QT adyuvante con oxaliplatino	ABCB1 rs1045642, rs1128503 y rs2032582	Los portadores de los alelos rs1045642 C/T y rs2032582 C/T-T/T presentan un pronóstico favorable
Yue AM (2013) ⁶⁵⁰	428 pacientes estadios I-IV resecados 80.1% QT adyuvante basada en oxaliplatino o fluoropirimidinas	ABCB1 rs1045642 y rs2032582	Los portadores de los alelos rs1045642 C/T- C/C y rs 2677 G/T-T/T-G/A-A/A presentan un pronóstico favorable
Cecchin E (2013) ⁴¹	144 pacientes estadio II -III QT adyuvante con FOLFOX4	3 SNP ABCB1, 6 ABCC1, 8 ABCC2 y 3 ABCG2	La incidencia de neuropatía grado ≥2 es menor en portadores de ABCC1 rs2074087 G/C-C/C y mayor en portadores de ABCC2 rs1885301 G/A-A/A, rs717620 C/T-T/T, rs4148396 C/T-T/T y rs3740066 C/T-T/T
Balcerczak E (2010) ⁸¹⁴	95 pacientes estadio I-IV resecados 42.1% QT adyuvante con 5-FU/LV	ABCB1 rs1045642, rs1128503 y rs2032582	Mejor SG en pacientes portadores del genotipo ABCB1 rs1128503 C/T-T/T
McLeod HL (2010) ⁴⁸⁹	520 pacientes con CCR avanzado tratados con IFU/FOLFOX/oxaliplatino- irinotecán	3 SNP ABCB1, 2 ABCC1, 5 ABCC2 y 1 ABCG2	No asociación entre los SNPs, la respuesta, la supervivencia o la toxicidad
Panczyk M (2009) ⁸¹²	95 pacientes estadio II-III QT adyuvante 5-FU/LV	ABCB1 rs1045642, rs1128503 y rs2032582	El alelo rs1045642 C/T-T/T se asocia a una supervivencia superior
Gamelin L (2007) ⁸¹⁷	135 pacientes con CCR avanzado FOLFOX	ABCC2 rs3740066 y rs717620	No asociación entre los SNPs y el riesgo de neuropatía

5.7. POLIMORFISMOS EN GENES IMPLICADOS EN LA ADHESIÓN E INVASIVIDAD CELULAR

5.7.1. Polimorfismos en moléculas de adhesión intercelular: selectina y molécula de adhesión intercelular (ICAM)-1

Las selectinas son una familia de moléculas de adhesión intercelular que se expresan en leucocitos, células endoteliales y plaquetas, y desempeñan un papel clave en la adhesión y migración de las células tumorales y en el desarrollo de metástasis⁸³⁴. Esta familia consta de 3 miembros, E-, L- y P-selectina, de los que la E-selectina (SELE) es la que se ha estudiado en mayor medida en relación con la susceptibilidad o el pronóstico de distintas neoplasias⁸³⁵⁻⁸³⁹. De los SNPs identificados en este gen, el más común, el rs561 A>C, consiste en la sustitución de una serina por una arginina (Ser128Arg) en el dominio extracelular del receptor, lo cual aumenta la afinidad por sus ligandos⁸⁴⁰. Varios trabajos⁸⁴¹⁻⁸⁴⁵ y meta-análisis⁸⁴⁶ concluyen que el alelo mutado rs5361C aumenta la susceptibilidad a desarrollar distintos tumores y es un factor pronóstico adverso. En CCR, un estudio reciente de pacientes con estadio II-III concluye que los portadores del alelo rs5361 Arg presentan un mayor riesgo de recaída y muerte que aquellos con el alelo WT⁸⁴⁷.

En cuanto a ICAM-1, también conocido como CD54, es una glicoproteína transmembrana perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas⁸⁴⁸. Está presente en la superficie de varios tipos celulares como leucocitos, células epiteliales, células endoteliales, fibroblastos y queratinocitos, y juega un papel fundamental en las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular y en la señalización celular⁸⁴⁹. Varios trabajos han demostrado que los niveles de expresión elevados de ICAM-1 o de su forma soluble (sICAM-1) se asocian con el tamaño tumoral, el grado o el riesgo de metástasis ganglionares y hematógenas en distintas neoplasias^{836,838,850-852}. Además, se han descrito varios polimorfismos que pueden modular la expresión de ICAM-1. Algunos estudios recientes han objetivado que algunos SNPs en regiones exónicas (rs5498 y rs549) o intrónicas (rs281432) de ICAM-1 y en la región entre ICAM-1 e ICAM-4 (rs3093030) confieren una mayor susceptibilidad a desarrollar cáncer de mama⁸⁵³, gástrico⁸⁵⁴, tumores urológicos⁸⁵⁶ o de cavidad oral⁸⁵⁶. Sin embargo, la asociación de estos SNPs con el pronóstico de los pacientes con CCR no se ha evaluado hasta la fecha.

5.7.3. Polimorfismos en metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP)

Las MMP son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc que desempeñan un papel crítico en la invasión tumoral y el desarrollo de metástasis, ya que son capaces de degradar componentes esenciales de la matriz extracelular como las membranas basales, el colágeno y la fibronectina^{857,858}. La familia de MMPs humanas, constituida por al menos 26 proteasas, puede dividirse en varios subgrupos de acuerdo con su estructura y la especificidad por sus sustratos: colagenasas, gelatinasas, estromelisininas, matrilisinas y MMPs de membrana⁸⁵⁹. Entre las MMPs estudiadas en mayor medida en los tumores humanos se encuentran MMP1, MMP2, MMP3, MMP7 y MMP9, cuya sobreexpresión se asocia con un mayor riesgo de invasión y metástasis y con un pronóstico desfavorable en CCR⁸⁶⁰.

Se han identificado varios SNPs funcionales en estos genes. El mejor caracterizado en MMP1, rs1799750 (-1607 1G>2G), consiste en la inserción de una guanina en su región promotora, dando lugar a la secuencia 5'-GGAT-3' a la que se une la familia de factores de transcripción EST. Por ello, el alelo 2G implica una actividad transcripcional significativamente superior⁸⁶¹. Múltiples estudios⁸⁶²⁻⁸⁶⁴ y meta-análisis⁸⁶⁵⁻⁸⁶⁹ han demostrado que la presencia del alelo -1607 2G incrementa el riesgo de metástasis⁸⁶⁶ y se asocia con una mayor susceptibilidad a desarrollar distintos tumores, entre ellos el CCR⁸⁶³⁻⁸⁶⁵. De acuerdo con estos datos, un estudio francés llevado a cabo en 201 pacientes con CCR objetiva que el alelo 2G implica una SG desfavorable, independientemente del estadio y del empleo de QT⁸⁷⁰. Sin embargo, un segundo estudio en una población similar obtiene conclusiones opuestas, presentando los pacientes portadores del genotipo 2G/2G una SG superior⁸⁷¹.

MMP3 contiene otro SNP relevante, rs3025058 (-1171 5A>6A), consistente en la inserción/deleción de una adenosina en la región promotora, lo cual da lugar a un alelo con 5 adenosinas (5A) y otro con 6 (6A)⁸⁷². La actividad transcripcional de MMP3 en portadores del alelo 5A es el doble que la de aquellos con el alelo 6A⁸⁷². Aunque la variante polimórfica reduce el riesgo de metástasis en un meta-análisis reciente⁸⁶⁶, otros trabajos no han confirmado la asociación de este SNP con el riesgo de cáncer^{862,865} y su valor pronóstico en CCR no se ha establecido establecido en la actualidad⁸⁷⁰.

Finalmente, entre los SNPs relevantes en las gelatinasas MMP2 y MMP9 destacan MMP2 rs243866 (-1575 G>A) y MMP9 rs3918242 (-1562 C>T)⁸⁷³. En el caso de MMP2, aunque el alelo -1575A implica una reducción de la actividad transcripcional

de MMP2⁸⁷⁴, los resultados de los estudios que han evaluado su asociación con el riesgo de CCR o su pronóstico no son concluyentes^{862,865,871,874,875} y un trabajo reciente demuestra un riesgo de metástasis a distancia superior en pacientes portadores del genotipo A/A⁸⁷⁶. Respecto a MMP9 rs3918242, la actividad transcripcional es superior en presencia del alelo T⁸⁷⁷. De acuerdo con esto, algunos trabajos han encontrado una asociación significativa entre dicho alelo y el desarrollo de metástasis⁸⁶⁶ o el riesgo de CCR⁸⁷⁸, pero otros trabajos no han confirmado estos resultados^{862,863-865,876}.

5.8. POLIMORFISMOS EN LA FAMILIA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO INSULÍNICO (IGF)

La familia del factor de crecimiento insulínico (IGF) incluye una serie de péptidos relacionados con la insulina entre los que se encuentran IGF-1 e IGF-2, sus receptores de superficie celular (IGF-1R e IGF-2R), seis proteínas de unión a IGF (IGF-1-6) y varias proteasas que interaccionan con IGFBP⁸⁷⁹. Aproximadamente el 90% del IGF-I se une a la proteína transportadora IGFBP-3 en el torrente circulatorio, la cual regula su distribución y biodisponibilidad⁸⁸⁰. El eje IGF-IGFR-IGFBP activa varias vías de señalización intracelular que controlan la proliferación, diferenciación, migración y supervivencia como RAS-Raf-MAPK, PI3K-Akt y NF-κB, por lo que desempeña un papel clave en la regulación del crecimiento celular fisiológico y en la transformación neoplásica^{881,882}. Se ha demostrado que los niveles elevados de IGF-1 e IGF-1R y los niveles bajos de IGFBP-3 se asocian con un aumento del riesgo de varias neoplasias^{881,883}.

Teniendo en cuenta estos datos, se ha postulado que los polimorfismos en los genes de la familia del IGF podrían modificar el riesgo de cáncer o el pronóstico de los pacientes. Múltiples estudios epidemiológicos y meta-análisis han encontrado que los SNPs de IGF-1 (969(CA)n, -533 T>C, -1410 C>T, 91565 G>A, 40864 C>T, 130 G>A, 2716 G>A)⁸⁸⁴⁻⁸⁹³, IGF-2 (680 G>A)⁸⁸⁶, IGF-1R (-26 T>C, 3129 G>T, 3129 G>A)⁸⁹⁴, IGF-2R (5002 G>A, 901 C>G)⁸⁹⁵ e IGFBP-3 (-202 A>C, -806 G>A, 95 C>G, 2133 G>C)^{885-889,891,892,896,897} modulan la susceptibilidad a desarrollar distintos tumores, entre ellos el CCR, pero los resultados no son concluyentes. Además, un trabajo reciente ha identificado cuatro polimorfismos en IGF-1 (91565 G>A, 1830 G>A, 2716 G>A, 40864 C>T) e IGF-1R (7-20 T>C, 3129 G>T, 3129 G>A) que se asocian con una SLP y/o SG desfavorable en pacientes con CCR metastásico refractario KRAS WT tratados con cetuximab en monoterapia⁸⁹⁸, lo cual sugiere que la combinación de los inhibidores de EGFR e IGF-1R podría ser una estrategia prometedora a explorar.

5.9. POLIMORFISMOS EN GENES IMPLICADOS EN EL CICLO CELULAR

El ciclo celular está estrechamente regulado por la activación e inactivación de los complejos ciclinas (CCN)-ciclinas dependientes de quinasas (CDKs) en los sucesivos puntos de control⁸⁹⁹. Por ello, la desregulación de las moléculas implicadas en los mismos desempeña un papel crítico en la transformación neoplásica.

Múltiples estudios recientes han evaluado la asociación entre las variantes polimórficas de los genes implicados en el ciclo celular y la susceptibilidad a desarrollar CCR o el pronóstico de los pacientes. Kim et al. analizaron 45 SNPs en distintas CCN y CDK en 450 pacientes con CCR y concluyeron que los portadores homocigotos de la variante alélica A en el SNP CCNA2 rs769236, implicada en el control de la transición de la fase G2 a la fase M del ciclo celular, presentaban un mayor riesgo de desarrollar esta neoplasia⁹⁰⁰. La CCND1, el gen estudiado en mayor medida en este contexto, participa en la regulación del punto de control G1/S, conduciendo su sobreexpresión a una transición prematura a través del mismo y a la acumulación de errores genéticos que favorecen la proliferación celular anormal⁹⁰¹. Se ha descrito un SNP común silente en este gen, rs6033965 (870 G>A), que no implica un cambio de aminoácido (Pro241Pro), pero sí una variante de splicing alternativa con una vida media más prolongada y una mayor activación de la CCND1 en portadores del alelo A⁹⁰². Numerosos estudios han evaluado la asociación entre este SNP y el riesgo de CCR⁹⁰³⁻⁹¹⁰, con resultados inconsistentes, aunque la mayor parte de los meta-análisis recientes concluyen que el riesgo de CCR es mayor en portadores del alelo A, sobre todo en la población caucásica⁹⁰⁶⁻⁹⁰⁹. Respecto a su valor pronóstico, un estudio austriaco llevado a cabo en dos cohortes de pacientes con CC estadios II-III tratados con QT adyuvante basada en 5-FU también ha demostrado que los pacientes con el genotipo A/A que reciben adyuvancia presentan un tiempo hasta la recaída significativamente inferior que aquellos con el alelo WT, aunque no se encontraron diferencias relevantes es aquellos tratados sólo con cirugía⁹¹¹. De acuerdo con estos datos, dos estudios en CC avanzado también han encontrado una supervivencia desfavorable en pacientes con el genotipo A/A tratados con irinotecán⁹¹² y cetuximab^{736,912}. Finalmente, el polimorfismo rs2230641 T>C de la CCNH, implicada en el control del ciclo celular pero también en la regulación de la actividad transcripcional de la RNA polimerasa II y en la reparación del DNA⁹¹³, se ha relacionado con un mayor riesgo de desarrollar neuropatía grado 2-3 en pacientes con CC estadios II de alto riesgo y estadio III tratados con QT adyuvante basada en oxaliplatino⁹¹⁴.

En cuanto a TP53, como “guardian del genoma”, funciona como un gen supresor tumoral que se une a las secuencias regulatorias de varios genes diana en respuesta a distintas agresiones como el daño celular, la hipoxia, el estrés metabólico o la activación de oncogenes. Induce de esta forma la detención transitoria del ciclo celular para facilitar los mecanismos de reparación del ADN cuando éste es dañado, o bien, pone en marcha el proceso de apoptosis/senescencia cuando el daño genético es irreparable. La pérdida de estas funciones cruciales conlleva la replicación del ADN defectuoso y la inestabilidad genómica, por lo que se considera crítico en la tumorigénesis⁹¹⁵. Se han descrito más de 200 SNP en este gen, de los cuales rs1042522 (215 C>G) es el que se ha estudiado en mayor medida⁹¹⁶. Este SNP implica la sustitución de una arginina por una prolina (Arg72Pro) en el codón 74, dando lugar a una variante con menor capacidad de inducir la transcripción de sus genes dianas y de poner en marcha la apoptosis⁹¹⁷. De acuerdo con esto, varios estudios y meta-análisis han establecido que los pacientes portadores del alelo Pro presentan un mayor riesgo de CCR⁹¹⁸⁻⁹²¹ o una supervivencia desfavorable⁹²², pero otros autores no han podido confirmar estos resultados⁹²³⁻⁹²⁵.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las premisas en las que nos basamos para postular el siguiente proyecto son las siguientes:

1. Las principales guías de práctica clínica consideran la QT basada en oxaliplatino y fluoropirimidinas como el tratamiento adyuvante estándar en los pacientes con CC estadio III y estadio II con alto riesgo de recidiva. Sin embargo, un porcentaje importante de casos no se beneficia de dicho tratamiento, bien porque la cirugía es suficiente para conseguir la curación o porque se va a producir una recaída a pesar de la adyuvancia. Por ello, resulta esencial el desarrollo de biomarcadores pronósticos y predictivos que faciliten la identificación de los pacientes con mayor riesgo de recidiva y quimioresistencia, permitiendo así la individualización de la terapia adyuvante.

2. Se han identificado múltiples variantes en línea germinal en genes implicados en el metabolismo, transporte y detoxificación del oxaliplatino y las fluoropirimidinas, entre las que destacan los SNPs. Estas variantes pueden alterar de forma significativa la función del gen, contribuyendo a explicar, por tanto, las diferencias interindividuales en el pronóstico de la enfermedad y el desarrollo de efectos adversos. Además, se han estudiado numerosos polimorfismos en genes implicados en los procesos de reparación del ADN, angiogénesis, invasividad, ciclo celular u otras vías de oncogénicas relevantes, que también pueden modular el riesgo de recaída o toxicidad.

3. La mayoría de los estudios publicados hasta la fecha han utilizado una metodología basada en el análisis de uno o unos pocos polimorfismos. Aunque esta aproximación puede ser de utilidad, implica el conocimiento previo de los mismos así como la función de los genes implicados, lo cual ha generado con frecuencia resultados contradictorios. Además, puesto que la QT puede actuar sobre múltiples dianas, es poco probable que un único polimorfismo pueda explicar la diversidad de los resultados terapéuticos. Por el contrario, los recientes avances en las técnicas de genotipado ofrecen la posibilidad de analizar simultáneamente un gran número de SNPs, aproximación que parece tener mayor capacidad de detectar diferencias genéticas interindividuales respecto a la respuesta a los fármacos o la toxicidad.

4. El valor pronóstico y predictivo de los polimorfismos mencionados se ha analizado fundamentalmente en pacientes con CCR avanzado. En los estadios iniciales, la mayor parte de los estudios se han llevado a cabo en pacientes tratados con fluoropirimidinas, mientras que la farmacogenética de la QT adyuvante basada en oxaliplatino apenas ha sido evaluada hasta la fecha.

Hipótesis y Objetivos

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, nos planteamos las siguientes hipótesis de trabajo:

A. El análisis masivo de los SNPs en genes implicados en el metabolismo, transporte y detoxificación del oxaliplatino y las fluoropirimidinas, los mecanismos de reparación del ADN y otras vías de señalización oncogénica relevantes permite estratificar a los pacientes con CC estadios II y III tratados con QT adyuvante en distintos grupos pronósticos en función del riesgo de recidiva, así como explicar las diferencias interindividuales en el desarrollo de toxicidad.

B. El estudio de estos SNPs facilitaría la selección de una estrategia terapéutica individualizada para cada paciente, lo cual implicaría una mejora del pronóstico a largo plazo y un menor deterioro de la calidad de vida atribuible a la toxicidad del tratamiento.

2. OBJETIVOS DEL TRABAJO

Se proponen los siguientes objetivos en un grupo de pacientes con CC estadio III y estadio II de alto riesgo tratados de forma adyuvante con QT basada en oxaliplatino y fluoropirimidinas y de los que se dispone de un adecuado seguimiento clínico:

A. Objetivo principal: Identificar aquellos SNPs en genes relacionados con el metabolismo y/o detoxificación del oxaliplatino y las fluoropirimidinas, la reparación del ADN y otras vías de señalización oncogénicas relevantes con capacidad de estratificar a los pacientes en distintos grupos pronóstico determinados por la SLE.

B. Objetivos secundarios:

- Evaluación del valor pronóstico de las variables clínico-patológicas clásicas, analizando su asociación con la SLE.
- Determinar la asociación de los SNPs estudiados con la SG.
- Evaluación de la interacción entre los SNPs con valor pronóstico y las variables clínico-patológicas con el objetivo de determinar la independencia del sistema predictivo basado en los polimorfismos respecto al resto de variables.
- Identificar los SNP relacionados con la toxicidad global grado 3-4 así como con las toxicidades específicas (hematológica, gastrointestinal y neurotoxicidad).

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio exploratorio, retrospectivo y multicéntrico en el que se pretende evaluar la posible asociación de 67 SNPs en 32 genes implicados en el metabolismo y detoxificación del oxaliplatino y las fluoropirimidinas y otras vías de señalización oncogénicas relevantes con el pronóstico y el desarrollo de toxicidad en pacientes con CC estadio II de alto riesgo y estadio III tratados con esquemas de QT adyuvante basados en estos fármacos (cohorte de diseño). Para validar los resultados obtenidos se ha utilizado una cohorte independiente de pacientes con CC estadio II de alto riesgo y estadio III tratados con los mismos esquemas de QT durante el mismo período de tiempo (cohorte de validación).

2. SELECCIÓN DE LOS PACIENTES. ESQUEMAS DE TRATAMIENTO

2.1. SELECCIÓN DE PACIENTES. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DE EXCLUSIÓN

La población de estudio está constituida por pacientes de origen caucásico intervenidos quirúrgicamente de un adenocarcinoma de colon estadio II de alto riesgo o estadio III y tratados con QT adyuvante basada en oxaliplatino y fluoropirimidinas según las indicaciones establecidas por las guías actuales de práctica clínica en 5 hospitales españoles en el período comprendido entre enero de 2004 y diciembre de 2009.

Se establecieron dos cohortes de pacientes:

- **Cohorte de diseño:** Pacientes reclutados en los Servicios de Oncología Médica del Hospital Universitario La Paz (Madrid) y Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda (Madrid).
- **Cohorte de validación:** Pacientes reclutados en los Servicios de Oncología Médica del Hospital Universitario La Fe (Valencia), Hospital General de Elche (Alicante), Instituto Valenciano de Oncología (IVO) y Hospital Universitario Clínic de Barcelona.

Las Tablas 24 y 25 recogen los criterios de inclusión y de exclusión de pacientes, respectivamente, para ambas cohortes.

Tabla 24: Criterios de inclusión

<i>Criterios de inclusión</i>
<ul style="list-style-type: none">• Edad ≥ 18 años• Cirugía potencialmente curativa de un adenocarcinoma de colon, definido como un tumor localizado a una distancia ≥ 15 cms del margen anal en la endoscopia diagnóstica o por encima de la reflexión peritoneal en el acto quirúrgico, sin evidencia inicial de diseminación a distancia.• Confirmación histológica de adenocarcinoma de colon estadio II de alto riesgo o estadio III según la sexta edición de la clasificación TNM de la AJCC del año 2002. Los estadios II de alto riesgo se definen por la presencia de al menos uno de los siguientes factores de mal pronóstico:<ul style="list-style-type: none">○ Tumores pT4○ Estadíaje ganglionar inadecuado (≤ 14 ganglios analizados en la pieza quirúrgica)○ Debut con obstrucción o perforación intestinal○ Invasión linfovascular o perineural○ Tumores pobremente diferenciados (grado 3)○ Nivel de CEA preoperatorio elevado (>5 ng/ml)• Disponibilidad de muestra tumoral conservada en parafina.• Función de la médula ósea y función orgánica adecuada demostrada mediante:<ul style="list-style-type: none">○ Recuento absoluto de neutrófilos $\geq 1.5 \times 10^9/L$, hemoglobina ≥ 9.0 g/dL y plaquetas $\geq 100 \times 10^9/L$.○ Alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) ≤ 2.5 x límite superior de la normalidad (LSN) y bilirrubina sérica total ≤ 1.5 x LSN.○ Creatinina sérica ≤ 1.5 x LSN• Tratamiento quimioterápico adyuvante con un esquema basado en oxaliplatino y fluoropirimidinas, iniciando dicho tratamiento dentro de las 8 semanas siguientes a la intervención quirúrgica.• Datos clínicos de seguimiento por un período mínimo de 3 años desde la fecha de la intervención quirúrgica, excepto en los casos de recidiva o de fallecimiento precoz.

Tabla 25: Criterios de exclusión

<i>Criterios de exclusión</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Evidencia macroscópica o microscópica de tumor residual en la pieza quirúrgica. • Tratamiento previo con QT o radioterapia neoadyuvante. • Disfunción hematológica, hepática o renal severa o historia de neuropatía periférica significativa. • Pacientes con enfermedades severas concurrentes o que hayan presentado otra neoplasia en los 5 años anteriores a la inclusión en el estudio (excepto cáncer in situ del cuello del útero adecuadamente tratado o cáncer cutáneo no melanoma). • MSI-H

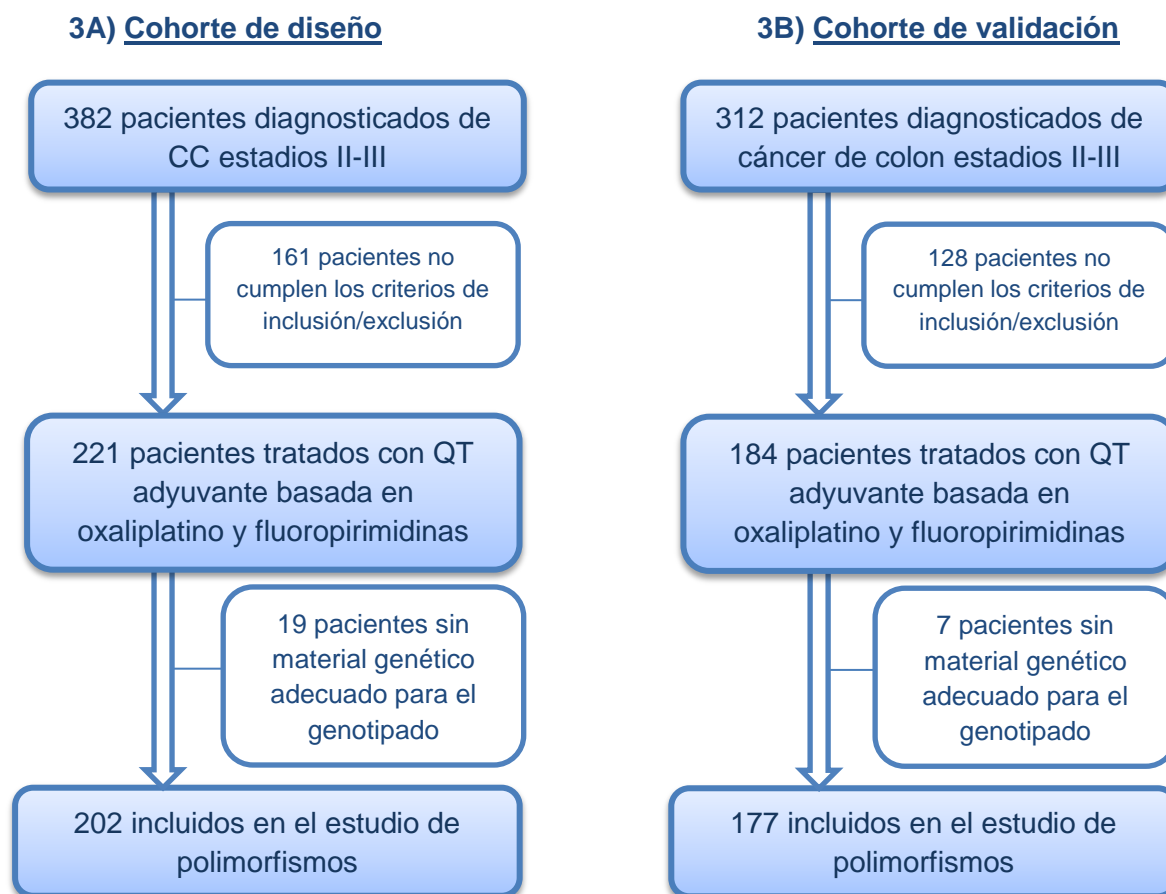
A través de las bases de datos de los Servicios de Anatomía Patológica de los distintos hospitales participantes, se identificaron los pacientes intervenidos quirúrgicamente de un CC estadio II o estadio III desde enero de 2004 a diciembre de 2009. Posteriormente, con la colaboración de los registros de los Servicios de Oncología Médica y Farmacia, se seleccionaron aquellos pacientes tratados con QT adyuvante basada en oxaliplatino y fluoropirimidinas que cumplieran todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión y que contaban con un seguimiento mínimo de tres años desde la cirugía (excepto en los pacientes con recidiva o fallecimiento en un intervalo de tiempo inferior).

Se reclutaron inicialmente un total de 405 pacientes. El estudio de polimorfismos fue posible en 202 de los 221 (91.4%) pacientes incluidos en la cohorte de diseño y en 177 de los 184 (96.19%) incluidos en la cohorte de validación de los que se obtuvo material histológico suficiente y de calidad adecuada para llevar a cabo el proceso de genotipado.

La Figura 3 muestra el diagrama de flujo en el que se describe cómo se realizó el proceso de selección de los pacientes.

Material y Métodos

Figura 3: Diagrama de flujo de la selección de pacientes incluidos en el estudio en las cohortes de diseño (3A) y de validación (3B)



2.2. CONSIDERACIONES ÉTICAS

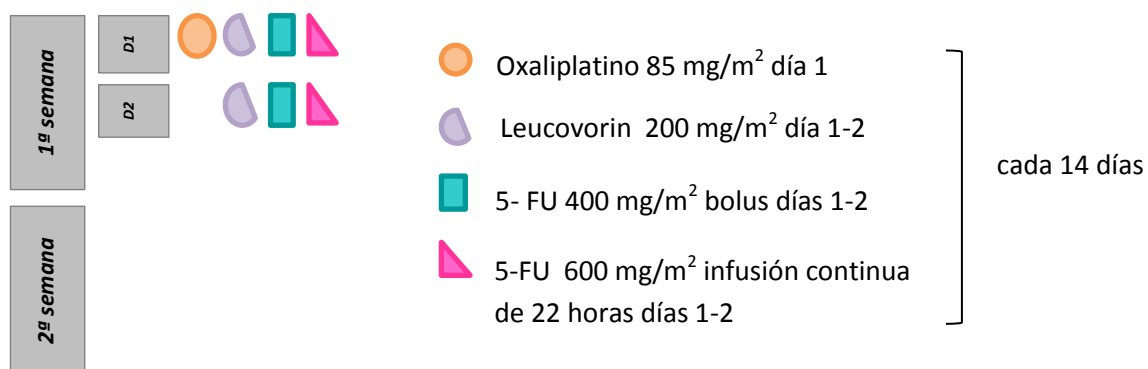
El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) de cada hospital participante. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado previo a su inclusión en el estudio, recogida de los datos clínico-patológicos y análisis de la muestra tumoral.

2.3. ESQUEMAS DE TRATAMIENTO ADYUVANTE

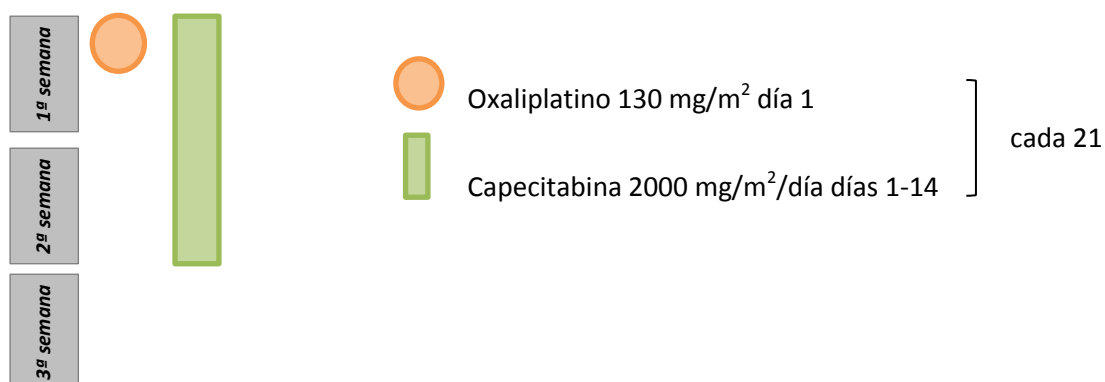
Todos los pacientes fueron tratados con un régimen de QT adyuvante basado en oxaliplatino y fluoropirimidinas (5-FU o capecitabina) a juicio del investigador de cada centro participante. La Figura 4 muestra los esquemas de tratamiento empleados:

Figura 4: Esquemas de QT adyuvante utilizados

a) FOLFOX4



b) CAPOX



Se administraron 12 ciclos del esquema FOLFOX4 y 8 ciclos del esquema CAPOX, con la excepción de los pacientes en los que fue necesaria una interrupción precoz de la QT por toxicidad inaceptable o en aquellos casos en los que se objetivó una recidiva o fallecimiento durante el tratamiento adyuvante.

2.4. PROTOCOLO DE SEGUIMIENTO

El protocolo de seguimiento de todos los hospitales incluye la anamnesis, exploración física y analítica completa con marcadores tumorales (CEA, antígeno carbohidrato 19.9) con periodicidad trimestral los dos primeros años, semestral desde el tercero al quinto año y anual a partir de quinto año en pacientes con alto riesgo de recidiva a juicio de cada investigador.

En cuanto a las pruebas de imagen, se realizó una TC de tórax-abdomen-pelvis semestral alternando con una ecografía de abdomen durante los dos primeros años, TC semestral desde el tercero al quinto año y anual a partir del quinto año en los casos con alto riesgo de recidiva. Otras pruebas más específicas, como la RMN hepática o la PET-TAC se llevaron a cabo sólo en los casos de sospecha de recidiva no confirmada mediante TC o a criterio del investigador.

Se realizó una colonoscopia completa al año de la cirugía en todos los pacientes, la cual se repitió cada 3 años si no se encontraban hallazgos patológicos en la exploración inicial y anualmente en el caso de que se diagnosticaran pólipos adenomatosos.

3. SELECCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS CANDIDATOS

Mediante la estrategia de genes candidatos, se seleccionaron 67 SNPs en 32 genes relacionados con el metabolismo y la detoxificación del oxaliplatino y las fluoropirimidinas, los mecanismos de reparación del ADN, la vía del EGFR, los mecanismos de angiogénesis asociados a la vía del VEGFR o independientes de la misma, el transporte de fármacos, los mecanismos de adhesión e invasividad celular u otras vías oncogénicas relevantes.

La información relativa a los polimorfismos, su localización, repercusión funcional u otros datos de interés se obtuvo a través de las bases de datos *International Haplotype Mapping (HapMap)* (<http://www.hapmap.org>), *National Center for Biotechnology Information SNP database* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) y *Ensembl Genome Browser* (<http://ensembl.org>).

Se utilizaron los siguientes criterios para seleccionar los genes incluidos en el estudio:

1. Base científica sólida que justifique su implicación en las vías oncogénicas previamente referidas.

2. Genes con variantes polimórficas bien documentadas y caracterizadas que supongan una alteración en la función del gen biológicamente relevante [datos publicados o función prevista de acuerdo con la base de datos Functional SNP (F-SNP) database, <http://compbio.cs.queensu.ca/F-SNP>].
3. Frecuencia del alelo menor en la población caucásica $\geq 3\%$. Para determinar las frecuencias alélicas relativas de los polimorfismos en las diferentes etnias, se consultó la sección de genética poblacional en la base de datos Ensembl Genome Browser: <http://uswest.ensembl.org/index.html>.

La Tabla 26 resume las características de los polimorfismos estudiados.

Tabla 26: Descripción de los polimorfismos incluidos en el estudio

Gen	dbSNPs ID	Polimorfismo	Localización	Región	Frecuencia alélica menor
METABOLISMO Y DETOXIFICACIÓN DE FLUOROPIRIMIDINAS					
Timidilato sintetasa (TS)	rs34743033	VNTR 28 bp TSER*2/TSER*3	18:657646-657730	5'-UTR	0.17
	rs2244500	c.280-1141 A>G	18:661005	Intrón	0.46
Dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD)	rs3918290	c.1905+1 G>A	1:97450058	Splicing	0.05
	rs6663628	c.2623-4295 C>A	1:97102927	Intrón	0.36
	rs970337	c.2623-20458 T>C	1:97119090	Intrón	0.40
Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)	rs1801133	c.677 C>T (Ala222Val)	1:11796321	Exón	0.33
	rs1801131	c.1298 A>C (Glu470Ala)	1:11794419	Exón	0.25
	rs6541003	c.780+396 C>T,	1:11795810	Intrón	0.39
Orotato fosforibosiltransferasa (OPRT)	rs1801019	c.638 G>C (Gly213Ala)	3:124737895	Exón	0.14
	rs3772807	c.1274-52 G>C	3:124743863	Intrón	0.27
METABOLISMO Y DETOXIFICACIÓN DE OXALIPLATINO					
Glutation S-transferase pi 1 (GSTP1)	rs1695	c.313 A>G (Ile105Val)	11:67585218	Exón	0.32
	rs749174	c.337-325 G>A	11:67585782	Intrón	0.25
Excision repair cross-complementing 1 (ERCC1)	rs11615	c.354 T>C (Asn118Asn)	19:45420395	Exón	0.23
	rs3212964	c.526-641 G>A	19:45417538	Intrón	0.14

Material y Métodos

Gen	Polimorfismo	Cambio de base	Localización	Región	Frecuencia alélica menor
METABOLISMO Y DETOXIFICACIÓN DE OXALIPLATINO/REPARACIÓN DEL ADN					
Excision repair cross-complementing 2 (ERCC2/XPD)	rs1799793	c.934 G>A (Asp288Asn)	19:45364001	Exón	0.32
	rs238404	c.1119-790 G>A	19:45362432	Intrón	0.44
	rs13181	c.2251 A>C (Lys751Gln)	19:45351661	Exón	0.31
Excision repair cross-complementing 5 (ERCC5/XPG)	rs4150279	c.468-384 C>T	13:102855668	Intrón	0.39
	rs4150360	c.2879+14C>T	13:102872412	Intrón	0.48
Excision repair cross-complementing 6 (ERCC6)	rs2228527	c.3637A>G (Arg1213Gly)	10:49470323	Exón	0.24
	rs7907557	c.4975 T>C	10:49452463	Intrón	0.45
X-ray repair cross-complementing group 1 (XRCC 1)	rs25487	c.1196 A>G (Arg399Gln)	19:43551574	Exón	0.35
	rs25489	c.839 G>A (Arg280His)	19:43552260	Exón	0.10
	rs12611088	c.144+6260 C>T	19:43568650	Intrón	0.30
	rs3213255	c.144+1555 C>T	19:43573355	Intrón	0.34
X-ray repair cross-complementing group 2 (XRCC 2)	rs3218536	c.31479 G>A (Arg188His)	7:152648922	Exón	0.09
	rs3218408	c.39+5510 T>G	7:152670531	Intrón	0.21
	rs3111471	C.40-5143 A>G	7:152665925	Intrón	0.23
RAD23 homólogo B (RAD23B)	rs2147072	c.67-2267 G>A	9:107297874	Intrón	0.29
	rs10759225	c.554-1311 A>G	9:107317441	Intrón	0.27
	rs1805329	c.746 C>T (Ala177Val)	9:107322047	Exón	0.16
Metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT)	rs1803965	c.159 C>T (Leu53Leu)	10:129707928	Exón	0.12
	rs656639	c. 4387 G>C	10:111864387	Intrón	0.38
Xeroderma pigmentoso, grupo de complementación A (XPA)	rs3176639	c.172+1294G>T	9:97695827	Intrón	0.32
	rs3176751	c.772+253 C>G	9:97675236	Downstream	0.06

Gen	Polimorfismo	Cambio de base	Localización	Región	Frecuencia alélica menor
METABOLISMO Y DETOXIFICACIÓN DE OXALIPLATINO/REPARACIÓN DEL ADN					
<i>Xeroderma pigmentoso, grupo de complementación C (XPC)</i>	<i>rs2733534</i>	c.2493+28 C>G	3:14147262	Intrón	0.33
VÍA DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGFR)					
<i>Factor de crecimiento epidérmico (EGF)</i>	<i>rs6824594</i>	c.2123-130 C>T	4:109983292	Intrón	0.37
	<i>rs929446</i>	c.1312+203 C>T,	4:109962188	Intrón	0.38
<i>Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)</i>	<i>rs1543848</i>	c.2115+10974 A>G	4:95016590	Intrón	0.26
<i>Homólogo 1 del oncogen viral del timoma murino (AKT1)</i>	<i>rs3803304</i>	c.1169+69 G>C	14:104772809	Intrón	0.27
	<i>rs10142069</i>	c.47-5517 A>G	14:104785733	Intrón	0.23
	<i>rs3001371</i>	c.284+165 G>A	14:105242831	Intrón	0.30
<i>Homólogo 2 del oncogen viral del timoma murino (AKT2)</i>	<i>rs2304186</i>	c.58 C>A	19:40233814	3'-UTR	0.45
	<i>rs7260517</i>	c.-85+9412 T>C	19:40276036	Intrón	0.26
ANGIOGÉNESIS					
<i>Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)</i>	<i>rs833070</i>	c.34+497 T>C	6:43774889	Intrón	0.44
	<i>rs3025039</i>	c.936 C>T	6:43784799	3'-UTR	0.12
<i>Interleuquina 8 (IL-8)</i>	<i>rs4073</i>	c.251 T>A	4:73740307	Upstream	0.40
	<i>rs2227306</i>	c.65-204C>T	4:73741338	Intrón	0.36
TRANSPORTE Y METABOLISMO DE FÁRMACOS					
<i>Transportador ATP-binding cassette, subfamilia G, miembro 1 (ABCB1)</i>	<i>rs1045642</i>	c.3435 C>T (Ile145Ile)	7:87509329	Exón	0.37
<i>Transportador ATP-binding cassette, subfamilia G, miembro 2 (ABCG2)</i>	<i>rs2231142</i>	c.421 C>A (Gln141Lys)	4:88131171	Exón	0.10
	<i>rs2728124</i>	c.8900 T>A	4:88085008	Intergénica	0.35
	<i>rs3114018</i>	c.-19-3415 T>G	4:88143429	Intrón	0.46
<i>Sulfotransferasa 1A1 (SULT1A1)</i>	<i>rs1968752</i>	c.-136-131 A>C	16:28620264	Intrón	0.26

Material y Métodos

Gen	Polimorfismo	Cambio de base	Localización	Región	Frecuencia alélica menor
ADHESIÓN E INVASIVIDAD CELULAR					
E-selectina (SELE)	rs5361	c.602 A>C (Ser128Arg)	1:169731919	Exón	0.09
	rs3917412	c.529+474 A>G	1:169731361	Intrón	0.24
	rs3917436	c.15+251 T>C	1:169725478	Intrón	0.29
Molécula de adhesión intercelular (ICAM1)	rs3093030	c.-286C>T	19:10286727	Upstream	0.41
Metaloproteinasa de matriz 1 (MMP1)	rs498186	c.-822T>G	11:102798914	Intrón	0.41
Metaloproteinasa de matriz 3 (MMP3)	rs602128	c.288 T>C (p.Asp96Asp)	11:102842734	Exón	0.45
OTROS					
Ciclina H (CCNH)	rs2230641	c.650 T>C (p.Val270Gly)	5:87399457	Exón	0.19
	rs3093816	c.601+132 T>C	5:87401570	Intrón	0.37
Receptor del factor de crecimiento insulínico (IGF-1R)	rs2229765	c.3147 G>A (p.Glu1050Glu)	15:98934996	Exón	0.38
	rs939626	c.3740+1239 C>T	15:98949947	Intrón	0.47
Mechanistic target of rapamycin (mTOR)	rs2295080	c.-168 C>A	1:11262571	Upstream	0.28
	rs357278	c.1299-99 A>C	5:38932364	Intrón	0.41
	rs6895953	c.3908 G>A	5:39084369	Intergénica	0.41
LSM3 homólogo, asociado a RNA nuclear U6 (LSM3)	rs2607739	c.22-489T>C	3:14181071	Intrón	0.34

Para el análisis de toxicidad, se seleccionaron únicamente 43 SNP en 19 genes implicados en las vías metabólicas de las fluoropirimidinas y el oxaliplatino, los mecanismos de reparación del ADN, el transporte de fármacos y el ciclo celular (Tabla 27).

Tabla 27: Polimorfismos incluidos en el análisis de toxicidad

Categoría	Gen	SNP
Metabolismo/detoxificación de fluoropirimidinas	Timidilato sintetasa (TS)	rs34743033, rs2244500
	Dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD)	rs3918290, rs6663628, rs970337
	Metilentetrahidrololato reductase (MTHFR)	rs1801133, rs1801131,rs6541003
	Orotato fosforibosiltransferasa (OPRT)	rs1801019, rs3772807
Metabolismo/detoxificación de oxaliplatino y genes de reparación del ADN	Glutation S-transferasa pi 1 (GSTP1)	rs1695, rs749174
	Excision repair cross-complementing 1 (ERCC1)	rs11615, rs3212964
	Excision repair cross-complementing 2 (ERCC2/XPD)	rs1799793, rs238404, rs13181
	Excision repair cross-complementing 5 (ERCC5/XPG)	rs4150279, rs4150360
	Excision repair cross-complementing 6 (ERCC6)	rs2228527, rs7907557
	X-ray repair cross-complementing group 1 (XRCC1)	rs25487, rs25489, rs12611088, rs3213255
	X-ray repair cross-complementing group 2 (XRCC2)	rs3218536,rs 3218408, rs3111471
	RAD23 homologo B (RAD23B)	rs2147072, rs10759225, rs1805329
	Metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT)	rs1803965, rs656639
	Xeroderma pigmentoso, grupo de complementación A (XPA)	rs3176751, rs3176639
	Xeroderma pigmentoso, grupo de complementación C (XPC)	rs2733534
Transporte de fármacos	Transportador de unión al ATP, subfamilia B, miembro 1 (ABCB1)	rs1045642
	Transportador de unión al ATP, subfamilia G, miembro 2 (ABCG2)	rs2231142, rs2728124, rs3114018
	Sulfotransferasa (SULT1A1)	rs1968752
Ciclo celular	<i>Ciclina H (CCNH)</i>	rs2230641, rs3093816

4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.1. OBTENCIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y ANATOMOPATOLÓGICOS

4.1.1. Variables clínicas y relacionadas con el tratamiento

A partir de las historias clínicas de los pacientes se recogieron de forma retrospectiva las siguientes variables clínicas y relacionadas con el tratamiento:

- Hospital de procedencia
- Edad al diagnóstico
- Sexo
- Fecha del diagnóstico
- Fecha de la intervención quirúrgica
- Localización tumoral
- Presencia de obstrucción intestinal al diagnóstico
- Presencia de perforación intestinal al diagnóstico
- Valor de CEA preoperatorio
- Valor de CEA postoperatorio
- Esquema de QT adyuvante administrado
- Número de ciclos de QT adyuvante
- Situación actual del paciente (vivo con/sin enfermedad, fallecido con/sin enfermedad)
- Fecha de la recidiva
- Localización inicial de la recidiva: locorregional o a distancia (con especificación de los órganos afectados)
- Fecha del fallecimiento
- Fecha de la última visita, recidiva o fallecimiento
- Supervivencia libre de enfermedad (SLE): Tiempo (meses) transcurrido desde la fecha de la intervención quirúrgica hasta la primera evidencia de recidiva. La SLE se censuró en la fecha del último seguimiento en los pacientes que continuaban libre de enfermedad en ese momento o en la fecha de fallecimiento.
- Supervivencia global (SG): Tiempo (meses) transcurrido desde la fecha de la intervención quirúrgica hasta el fallecimiento del paciente por cualquier causa.

4.1.2. Variables patológicas

La información anatomopatológica se obtuvo de los informes completos de la intervención quirúrgica emitidos por los Servicios de Anatomía Patológica de los hospitales participantes. Se recogieron las siguientes variables:

- Grado de diferenciación tumoral: grado 1 (bien diferenciado), grado 2 (moderadamente diferenciado), grado 3 (pobremente diferenciado).
- Estadío patológico del tumor primario (pT)
- Estadío patológico de la afectación ganglionar (pN)
- Número de ganglios resecados
- Número de ganglios afectados
- Estadío patológico TNM
- Permeación vascular
- Permeación linfática
- Permeación nerviosa

El estadío patológico TNM se asignó en base a la sexta edición de la clasificación TNM de la AJCC del año 2002.

Se creó una base de datos Excel para la recogida de las variables descritas, garantizándose en todo momento la confidencialidad de los pacientes mediante la asignación de un código numérico creado al efecto para la identificación del sujeto del que provenían los datos.

4.2. EVALUACIÓN Y MANEJO DE LA TOXICIDAD

La evaluación de la toxicidad hematológica y no hematológica se llevó a cabo de acuerdo con la versión 2.0 de la clasificación del National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (NCI-CTCAE) desde enero de 2004 hasta agosto de 2006, y según la versión 3.0 desde agosto de 2006 en adelante. A partir de las historias clínicas de los pacientes y de los análisis de sangre correspondientes se recogió de forma retrospectiva en la misma hoja Excel el grado de toxicidad en el día 1 de cada ciclo de tratamiento.

Se evaluaron los siguientes eventos adversos:

- Neutropenia
- Anemia
- Trombopenia
- Diarrea
- Mucositis
- Neurotoxicidad

Los aplazamientos y modificaciones de dosis se determinaron en base a la evaluación clínica y analítica realizada el día 1 de cada ciclo considerando la máxima toxicidad experimentada por el paciente en el ciclo previo. En el caso de ser necesaria la suspensión de oxaliplatino, se recomendó completar la adyuvancia con capecitabina/5-FU en monoterapia a juicio de cada investigador.

4.3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS. PROCESO DE GENOTIPADO

El proceso de genotipado se llevó a cabo a partir del material genético extraído de las muestras tumorales y peritumorales obtenidas durante la cirugía y conservadas en parafina en el banco de tejidos de los Servicios de Anatomía Patológica de los hospitales participantes. Para considerar que las muestras son adecuadas para el estudio molecular se definió arbitrariamente la necesidad de que existiera una riqueza en células tumorales de al menos el 80%. Para comprobarlo se realizaron cortes con el micrótopo de los bloques parafinados obteniendo secciones de 3-4 μm de espesor. Dichas secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina y fueron revisadas por el patólogo que certificó que el contenido tumoral era el requerido.

En cada centro se creó una referencia codificada para el procesamiento del tejido, con el fin de que la identidad del paciente quedara absolutamente resguardada y se garantizara la fiabilidad de los resultados.

4.3.1. Extracción, procesamiento y cuantificación del ADN genómico

La extracción del ADN fijado en formol y embebido en parafina se llevó a cabo mediante el kit “MasterPure™ Complete ADN Purification” (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA) según el protocolo establecido por el fabricante. Los pasos que se siguieron se describen a continuación:

1. Se disponen 5-15 secciones de parafina de 10-35 μm en tubos apropiados de 1.5 o 2 ml. Se añade 1 ml de xileno en cada tubo como disolvente orgánico de la parafina, se mezcla la preparación en el vórtex y se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos. El sobrenadante es retirado cuidadosamente mediante una pipeta sin arrastrar el pellet. Este paso de lavado con xileno fue repetido en 2-3 ocasiones hasta asegurar un resultado adecuado.
2. Se añade 1 ml de etanol al 100% al pellet para eliminar los residuos de xileno incubando la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente, hasta lograr de nuevo 2 fases en cada muestra. A continuación se retira el etanol manteniendo el pellet en el tubo, repitiendo el proceso de lavado en una segunda ocasión. El pellet es incubado manteniendo el tubo abierto a 37°C durante 10-15 minutos hasta lograr la evaporación del remanente de etanol.
3. Se diluye 2 μl de proteinasa K en 300 μl de solución de lisis celular y se añade 300 μl de esta mezcla a cada muestra. Las muestras se incuban a 65°C durante 30 minutos y se mezclan durante 10 segundos en el vórtex con el fin de lograr la lisis completa del tejido.
4. A continuación se procede al enfriamiento de las muestras durante 3-5 minutos hasta 37°C, se añade 1 μl de RNasa A, se mezcla la preparación y se incuba a 37°C durante 30 minutos con el fin de asegurar la inactivación de la enzima.
5. El paso final consiste en la precipitación del ADN. Para ello se añaden 150 μl del reactivo de precipitación a 300 μl de la muestra lisada y se agita vigorosamente durante 10 segundos. A continuación se sedimentan los residuos por centrifugación a 4°C durante 10 minutos en una microcentrífuga $\geq 10.000 \times g$ y se transfiere el sobrenadante a un tubo limpio de microcentrifugación desechando el sedimento. Se añaden 500 μl de isopropanolol al sobrenadante recuperado, se invierte el tubo 30-40 veces, se precipitan los ácidos nucleicos totales por centrifugación a 4°C y, finalmente, se vierte con cuidado el isopropanolol sin desalojar el sedimento.

La concentración del ADN de todas las muestras incluidas en el estudio fue cuantificada espectrofotométricamente empleando el sistema “Thermo Scientific™ 1000 NanoDrop ND spectrophotometer” (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).

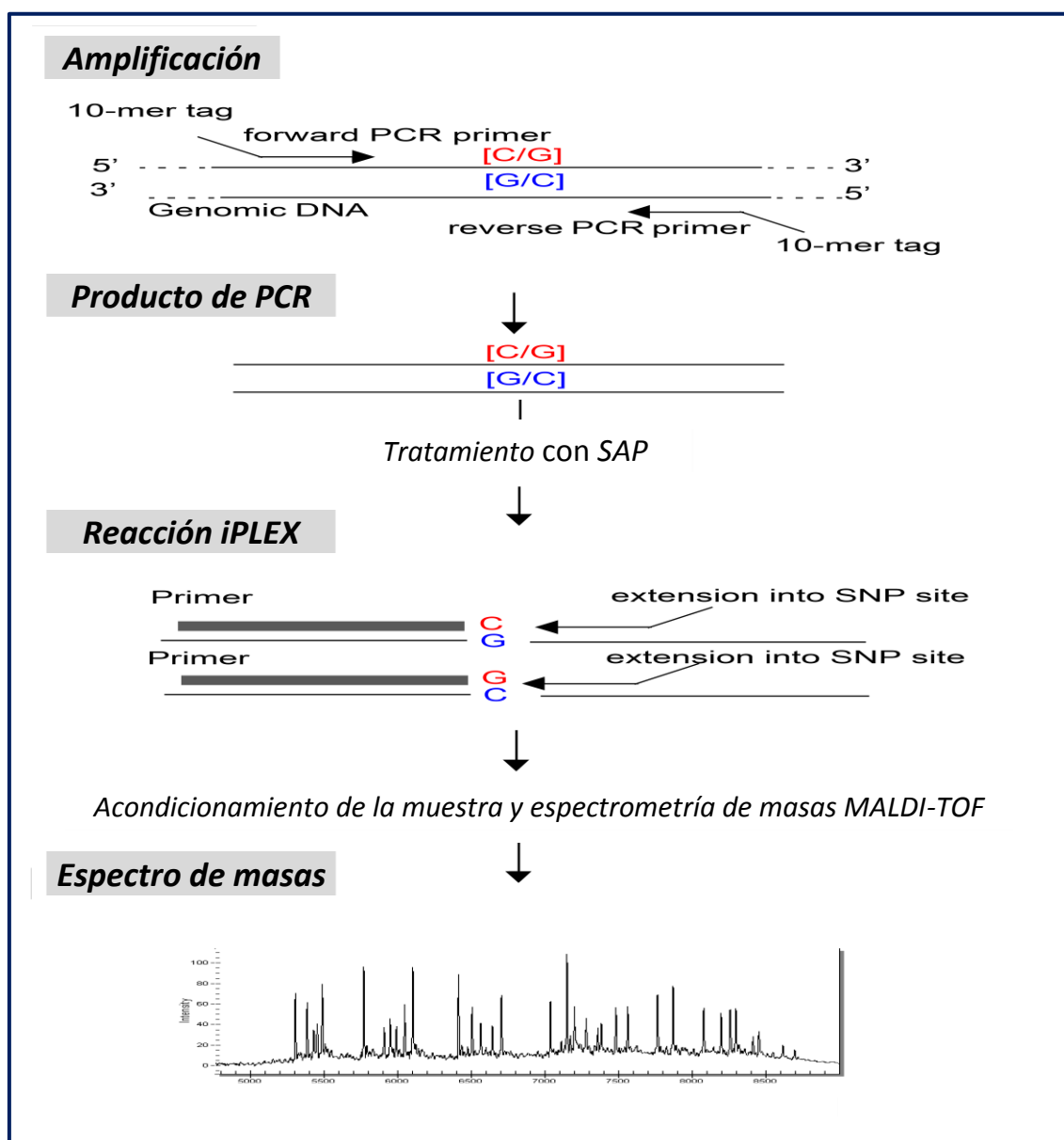
4.3.2. Genotipado mediante la tecnología iPLEX® Gold MassARRAY (SEQUENOM)

El estudio de los SNPs se llevó a cabo empleando la tecnología iPLEX® (Increased Plexing Efficiency and Flexibility) Gold MassARRAY (Sequenom) en un proceso que consta de los siguientes pasos (Figura 5)⁹²⁶⁻⁹²⁹:

1. Amplificación de los fragmentos de ADN que contienen los SNP de interés mediante una PCR multiplex.
2. Reacción de discriminación alélica de extensión de una única base (*single base extension*, SBE) mediante la tecnología iPLEX Gold.
3. Detección de los productos de extensión de dicha reacción mediante espectrometría de masas matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF).

Se utilizó el software MassARRAY Workstation versión 3.4 para el diseño de primers de PCR y extensión para cada SNP y asignación automática de masas, importando la información de las bases de datos públicas. Además, se empleó el programa eXTEND para reducir la probabilidad de errores de genotipado. Dicho programa lleva a cabo el mapeo proximal de los SNP (ProxSNP) para asegurar que los primers se unan y amplifiquen una región única (PreXTEND) y examina la combinación de todos los primers tras el diseño del ensayo para descartar la posibilidad de interacciones e hibridaciones cruzadas (PleXTEND)^{926,927}.

Un aspecto relevante cuando se llevan a cabo reacciones múltiples es el ajuste de la concentración de los primers de extensión para equilibrar los ratios señal/ruido, ya que una de las características fundamentales de la espectrometría de masas MALDI-TOF es la relación inversa existente entre el ratio señal/ruido y el aumento de la masa de los productos de discriminación alélica. A medida que la masa de dichos productos aumenta, los ratios tienden a disminuir y en los casos extremos la señal resulta indistinguible del ruido, dando lugar a errores de llamada. Para compensar este efecto, se duplicó la concentración de los primers correspondientes a los productos de extensión con mayor masa respecto a aquellos con masas más bajas (0.625uM: 1.25uM), asegurando de esta manera que las áreas pico se generan por los productos de mayor masa.

Figura 5: Esquema de la tecnología iPLEX® Gold MassARRAY (Sequenom)

4.3.2.1. Amplificación mediante PCR multiplex

Los fragmentos de ADN con los SNPs de interés fueron amplificados mediante una reacción de PCR multiplex. La PCR multiplex es una variante de la PCR convencional, cuyas condiciones han sido optimizadas para permitir la amplificación de varias secuencias diana simultáneamente, incluyendo varios primers en la misma reacción, así como aumentando la cantidad de los moldes de ADN y de ADN polimerasa. Se siguieron los pasos que se describen a continuación:

Material y Métodos

A. Combinación de los compuestos necesarios para llevar a cabo la reacción en un volumen total de 5 µl (Tabla 28) y mezcla de la preparación.

Tabla 28: Compuestos de la reacción de PCR

Reactivo	Concentración en 5 µl	Volumen (1rxn)	Volumen (384rxns)
ADN genómico problema (5-10 ng/µl)	5-10 ng/rxn	1000 µl	480 µl
ADN polimerasa termoestable (Taq pol) (5 U/ µl)	0.5 U/rxn	0.100 µl	48 µl
Mezcla de dinucleótidos trifosfato (dNTP) (25mM)	500 µM	0.100 µl	48 µl
Mezcla de cebadores (500 nM cada uno)	100 nM	1000 µl	480 µl
Tampón de la reacción de PCR con MgCl ₂ (10x)	1.25x	0.625 µl	300 µl
H ₂ O nanopura	ND	1.850 µl	888 µl
MgCl ₂ (25mM)	1.625 mM	0.325 µl	156 µl
Total		5.000 µl	2400 µl

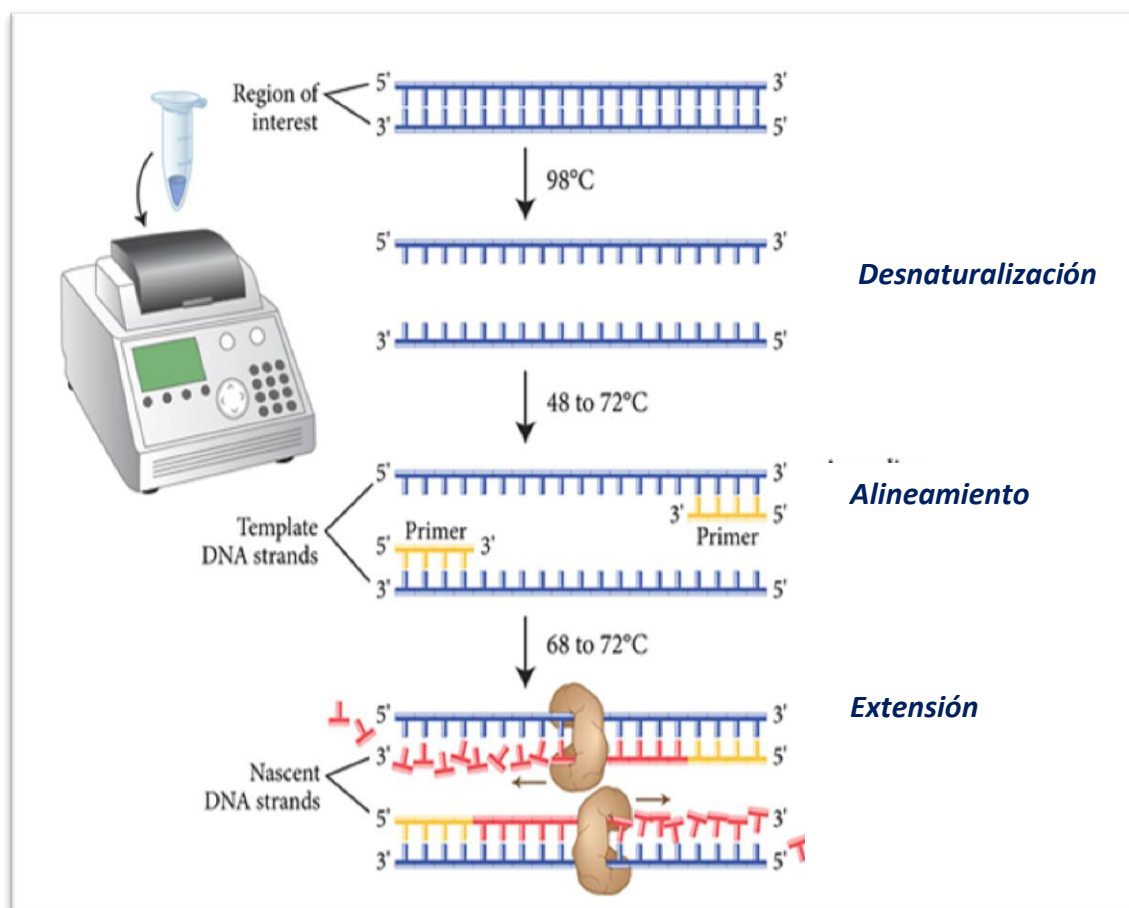
B. Puesta en marcha de la reacción de PCR en un termociclador convencional siguiendo el protocolo del fabricante a lo largo de las siguientes fases:

- **Inicio:** Se alcanza una temperatura de 94°C durante 15 minutos previo al inicio del ciclo para activar la ADN polimerasa termoestable.
- **Ciclo de PCR:** Se repiten 45 ciclos, consistente cada uno de ellos en tres cambios repetidos de temperatura (Figura 6):
 - **Desnaturalización:** Se alcanza una temperatura de 94°C durante 20 segundos, produciéndose la separación de las dos hebras de ADN.
 - **Alineamiento (“annealing”):** Tiene lugar la hibridación del cebador a su secuencia complementaria en el ADN molde, para lo cual es necesario bajar la temperatura a 56°C durante 30 segundos.
 - **Extensión:** Se requiere aumentar nuevamente la temperatura a 72°C durante 1 minuto, lo cual permite a la Taq polimerasa sintetizar una cadena de ADN complementario a la hebra molde partiendo del cebador como soporte inicial y añadiendo los dinucleótidos trifosfato (dNTPs) complementarios en dirección 5'→ 3'.

- **Elongación final:** Etapa única que se lleva a cabo a una temperatura de 72°C durante 3 minutos tras el último ciclo de PCR para asegurar que cualquier ADN de cadena simple sea totalmente amplificado.
- **Conservación:** Almacenamiento a 4°C durante un tiempo indefinido.

Un paso esencial tras la amplificación por PCR es añadir fosfatasa alcalina de renacuajo (SAP) a los productos de la reacción e incubar la mezcla en un termociclador convencional. Con ello se pretende defosforilar los dNTPs residuales y evitar así la aparición de picos contaminantes en las reacciones de extensión de los primers que puedan dificultar la interpretación de los resultados.

Figura 6: Etapas de la reacción de PCR



4.3.2.2. Reacción iPLEX Gold

La tecnología iPLEX Gold se basa en una reacción de discriminación alélica de SBE, en la cual un primer hibrida próximo al sitio polimórfico y extiende una base en función

Material y Métodos

de cada polimorfismo, generando una diferencia de masa en el producto de extensión según la base añadida^{926,928}. En nuestro estudio las reacciones de SBE post-PCR se llevaron a cabo en placas de 384 pocillos utilizando primers de extensión con terminaciones modificadas, ADN polimerasas y una serie de condiciones específicas. Se genotiparon 36 SNP por cada ensayo siguiendo los pasos que se describen a continuación:

A. Combinación de los compuestos necesarios para llevar a cabo la reacción iPLEX en un volumen total de 9 µl (Tabla 29) y mezcla de la preparación.

Tabla 29: Compuestos de la reacción iPLEX

Reactivo	Concentración en 9 µl	Volumen (1rxn)	Volumen (384rxns)
H ₂ O nanopura	ND	0.755 µl	362.40 µl
Enzima iPLEX	1X	0.041 µl	19.68 µl
Mezcla de terminadores iPLEX	1X	0.200 µl	96.00 µl
Mezcla de cebadores (7µM:14µM)*	0.625 µM: 1.25 µM	0.804 µl	385.92 µl
Tampón de la reacción iPLEX (10x)	0.222X	0.200 µl	96.00 µl
Total		2.0	960.0 µl

* 7 µM y 14 µM ilustran la doble concentración de los primers de alta masa en relación con los de baja masa. Los primers de baja masa deben estar a una concentración de 0.625 µM y los de alta masa a 1.25 µM en la reacción final de 9 µl

B. Puesta en marcha de la reacción iPLEX en un termociclador convencional utilizando un programa de 200 ciclos cortos a lo largo de las siguientes fases:

- 94° C durante 30 segundos
 - 94°C durante 5 segundos
 - 52°C durante 5 segundos
 - 80°C durante 5 segundos
 - 72°C durante 3 minutos
 - Conservación a 4°C durante un tiempo indefinido
- } 5 ciclos } 40 ciclos

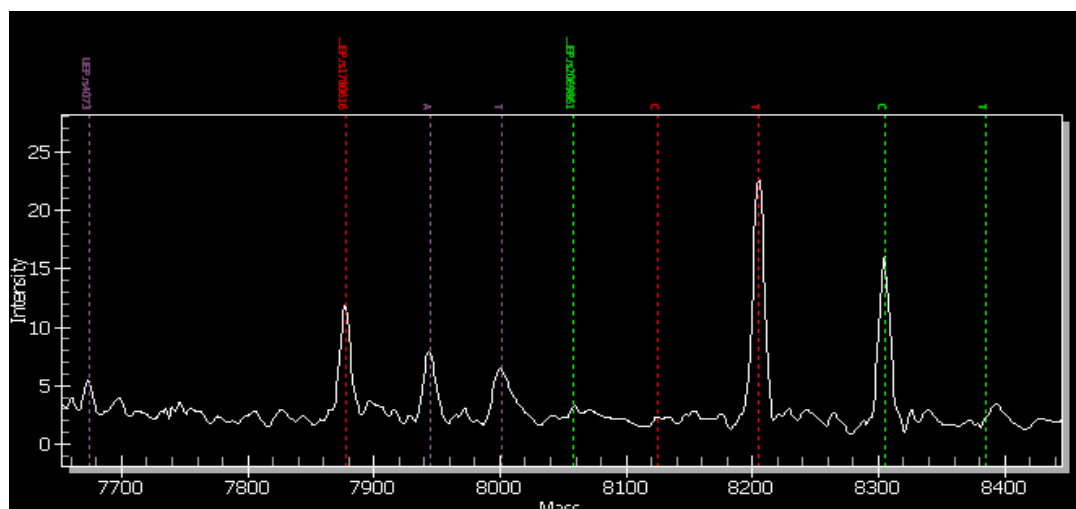
Este programa utiliza dos circuitos cíclicos, uno de 5 ciclos que está contenido en otro de 40 ciclos. La muestra se desnaturaliza a 94°C. A continuación, se produce la hibridación de las hebras a 52°C durante 5 segundos y posteriormente su extensión a 80°C durante 5 segundos. El ciclo de hibridación y extensión se repite 4 veces más, para computar un total de 5 ciclos, para volver a continuación a un paso de desnaturalización a 94°C durante 5 segundos que se continúa de nuevo con 5 ciclos de hibridación y extensión. Los 5 ciclos de hibridación y extensión junto con el paso de desnaturalización se repiten 39 veces más hasta llegar a un total de 40 ciclos. A continuación tiene lugar una etapa de extensión final (72°C durante 3 minutos), tras la cual la muestra se almacena a 4°C de forma indefinida. El aumento en el número de ciclos y la menor duración de cada uno de ellos permite conseguir mayores tasas de extensión por cada reacción.

Finalmente, se procedió a desalar los productos de la reacción iPLEX con el objetivo de optimizar el análisis espectrofotométrico. Para ello se diluyeron las muestras con 16 µL de agua y se añadieron 6 mg de resina, centrifugando posteriormente la preparación a 4000 rpm para eliminar la cantidad extra de resina depositada en la parte inferior del dispositivo.

4.3.2.3. Análisis mediante MALDI-TOF. Interpretación de los resultados.

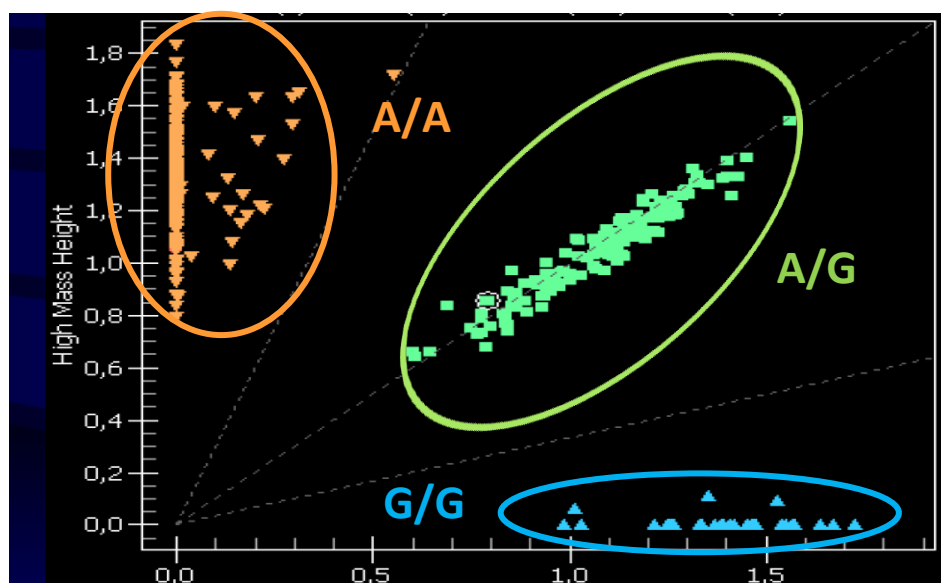
El proceso de genotipado de los SNPs fue llevado a cabo mediante espectrometría de masas MALDI-TOF⁹²⁷. Los productos de extensión de las reacciones iPLEX fueron transferidos de forma automatizada mediante un nanodispensador desde la placa de 384 pocillos a la superficie de un chip (SpectroCHIP bioarray) que es leído en el espectrómetro de masas, creando 384 puntos para la detección. El equipo puede leer hasta 10 chips secuencialmente de forma automática. El resultado final es un espectro de masas de los múltiples productos obtenidos empleando primers de extensión de diferentes longitudes en una única reacción, lo cual genera grupos de picos suficientemente espaciados^{926,928} (Figura 7).

Figura 7: Espectro de masas obtenido mediante espectrometría MALDI-TOF



A continuación se procesaron y analizaron las reacciones del iPLEX SpectroCHIP utilizando el software MassARRAY Workstation versión 3.4, el cual asigna genotipos a los SNPs en función de las masas obtenidas, estableciendo cuatro categorías: ausencia de señal, homocigoto para el alelo WT, heterocigoto y homocigoto para el alelo polimórfico. Como control para determinar la eficacia de cada reacción de extensión se emplea el pico correspondiente a los primers que no han extendido. El cálculo de los ratios de los picos de cada alelo permitió generar un informe con el análisis del cluster (Figura 8). Finalmente, los genotipos para cada SNP se exportaron a la base de datos de Excel descrita con anteriormente para el análisis estadístico.

Figura 8: Análisis de genotipos (software MassARRAY Workstation versión 3.4)



5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El objetivo principal del estudio fue evaluar el valor pronóstico de los SNP en relación con la SLE. Los objetivos secundarios fueron analizar la posible asociación de los SNP con la SG y la toxicidad.

En primer lugar se procedió al análisis descriptivo de las características basales de los pacientes y de los SNP. Los SNP fueron analizados como variables categóricas con tres categorías correspondientes a cada uno de los posibles genotipos. Se desglosaron las frecuencias genotípicas para cada uno de ellos con el objetivo de contrastar la ley o el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW). Para ello se comparó mediante un test de X^2 la distribución alélica observada con la esperada en base al EHW consultando las bases de datos *International Haplotype Mapping (HapMap)* y *Ensembl Genome Browser* (<http://ensembl.org>). La asociación de los SNP con las características demográficas, clínicas y patológicas de los pacientes fue examinada utilizando el test de Mann-Whitney en el caso de las variables continuas y el test de X^2 o el test exacto de Fisher en el caso de las variables categóricas.

Las curvas de SLE y SG se obtuvieron utilizando el método de Kaplan-Meier. Se realizó un análisis de Cox univariado para evaluar el valor pronóstico de las características clínico-patológicas y los genotipos de cada SNP en relación con la SLE y SG. Posteriormente, se utilizó un modelo de regresión múltiple para evaluar la posible implicación pronóstica independiente de los SNP en la SLE y la SG utilizando los datos clínico-patológicos y el esquema de QT como covariables. También se realizó el análisis estadístico agrupando los genotipos de los SNP con valor pronóstico en dos categorías con el objetivo de buscar las asociaciones más relevantes.

La relación entre la toxicidad severa global y las características clínico-patológicas, el tratamiento y los SNP fue analizada inicialmente utilizando una regresión logística univariada, realizándose posteriormente un análisis multivariante ajustando por la edad, el sexo y el esquema de QT adyuvante. También se evaluó la posible asociación entre cada SNP y el desarrollo de toxicidades severas específicas (neutropenia, trombopenia, anemia, diarrea, mucositis y neurotoxicidad) siguiendo el mismo procedimiento y considerando en el análisis el mayor grado de toxicidad experimentado durante el tratamiento.

Las diferencias encontradas se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de significación (valor p) fue ≤ 0.05 . Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software SAS version 9.2 (SAS Institute Inc; Cary, NC, USA).

V. RESULTADOS

1. EVALUACIÓN DESCRIPTIVA

1.1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS Y PATOLÓGICAS DE LAS COHORTES DE DISEÑO Y DE VALIDACIÓN

Se incluyeron 202 pacientes en la cohorte de diseño y 177 pacientes en la cohorte de validación. Las características clínicas y anatomopatológicas de la población de estudio se describen en la Tabla 30.

1.1.1. Cohorte de diseño

La mediana de edad al diagnóstico fue de 63.82 años, con un rango comprendido entre los 23 y los 85 años. En cuanto a la distribución por sexos, 115 (56.9%) pacientes fueron varones y 87 (43.1%) fueron mujeres. La localización tumoral más frecuente fue el sigma (49%) seguida del ciego-colon derecho (29.7%), colon izquierdo (13.9%) y colon transversal (7.4%). La mayoría de los pacientes presentaban un tumor grado 2 (79.2%). En cuanto a la distribución por estadios, 60 pacientes (29.7%) presentaban un estadio II de alto riesgo y 142 pacientes (70.3%) un estadio III. La incidencia de las principales características histológicas asociadas a un pronóstico desfavorable fue la siguiente: 88 (43.8%) pacientes presentaban invasión vascular, 56 (27.9%) invasión linfática, 72 (35.8%) invasión perineural, 56 (24.8%) obstrucción intestinal y 41 (20.3%) perforación intestinal.

1.1.2. Cohorte de validación

La mediana de edad al diagnóstico fue de 59.8 años, con un rango comprendido entre los 23 y los 76 años. Noventa y ocho (55.4%) pacientes fueron mujeres, mientras que 79 (44.6%) fueron varones. La mitad de los tumores (50.8%) se encontraron en el sigma, siendo las siguientes localizaciones más frecuentes el ciego-colon derecho (33.1%), el colon izquierdo (13.6%) y el colon transversal (4.5%). El 64.4% de los pacientes fue diagnosticado de un tumor moderadamente diferenciado, 132 (74.6%) pacientes presentaban un estadio III y 45 (25.4%) un estadio II de alto riesgo. En cuanto a la distribución de los principales factores de riesgo, 39 (22%) pacientes presentaban invasión vascular, 68 (38.4%) invasión linfática, 46 (26%) invasión perineural, 36 (20.3%) obstrucción intestinal y 20 (11.3%) perforación intestinal.

La incidencia de tumores grado 2 ($p=0.017$), invasión linfovascular ($p=0.032$) y perineural ($p=0.025$) y perforación intestinal ($p=0.012$) fue significativamente superior en la cohorte de diseño que en la de validación. No se objetivaron diferencias entre las dos cohortes en cuanto al resto de características clínico-patológicas.

Resultados

Tabla 30: Características clínico-patológicas de las cohortes de diseño y de validación

CARACTERÍSTICA	Nº DE PACIENTES (%)		
	Población total (n=379)	Cohorte diseño (n=202)	Cohorte validación (n=177)
Edad mediana (rango)	61.94 (23-85)	63.82 (23-85)	59.8 (23-76)
Sexo			
Hombre	194 (51.2%)	115 (56.9%)	79 (44.6%)
Mujer	185 (48.8%)	87 (43.1%)	98 (55.4%)
Localización tumoral			
Ciego- colon derecho	115 (30.3%)	60 (29.7%)	55 (33.1%)
Colon transverso	23 (6.1%)	15 (7.4%)	8 (4.5%)
Colon izquierdo	52 (13.7%)	28 (13.9%)	24 (13.6%)
Sigma	189 (49.9%)	99 (49%)	90 (50.8%)
Diferenciación			
Grado 1	60 (15.8%)	19 (9.4%)	41 (23.2%)
Grado 2	274 (72.3%)	160 (79.2%)	114 (64.4%)
Grado 3	45 (11.9%)	23 (11.4%)	22 (12.4%)
Categoría T			
T1	1 (0.3%)	1 (0.5%)	0 (0%)
T2	12 (3.2%)	10 (4.9%)	2 (11.3%)
T3	269 (70.9%)	145 (71.8%)	124 (70.1%)
T4	97 (25.6%)	46 (22.7%)	51 (28.8%)
Categoría N			
N0	105 (27.7%)	56 (27.7%)	49 (27.7%)
N1	174 (45.9%)	80 (39.6%)	94 (53.1%)
N2	100 (26.4%)	41 (20.3%)	59 (33.3%)
Estadio			
II	105 (27.7%)	60 (29.7%)	45 (25.4%)
III	274 (72.3%)	142 (70.3%)	132 (74.6%)
Invasión vascular			
Sí	127 (33.6%)	88 (43.8%)	39 (22%)
No	251 (66.4%)	113 (56.2%)	138 (78%)
Invasión linfática			
Sí	124 (32.8%)	56 (27.9%)	68 (38.4%)
No	254 (67.2%)	145 (72.1%)	109 (61.6%)

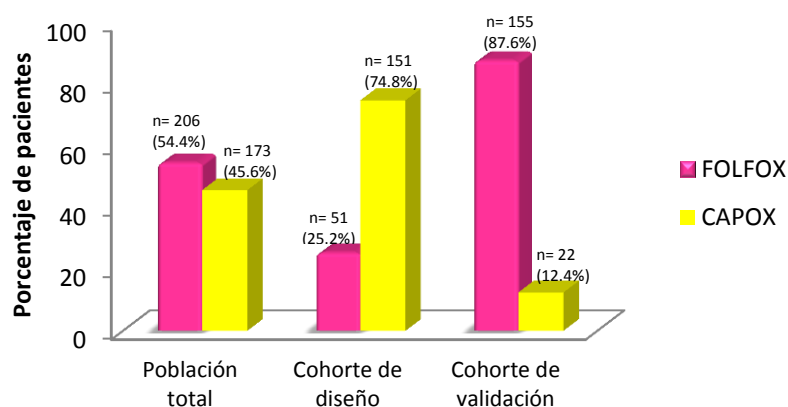
CARACTERÍSTICA	Nº DE PACIENTES (%)		
	Población total (n=379)	Cohorte diseño (n=202)	Cohorte validación (n=177)
Invasión linfovascular*			
Sí	164 (43.3%)	98 (48.5%)	76 (42.9%)
No	215 (56.7%)	104 (51.5%)	101 (57.1%)
Invasión perineural			
Sí	118 (31.2%)	72 (35.8%)	46 (26%)
No	260 (68.8%)	129 (64.2%)	131 (74%)
Obstrucción intestinal			
Sí	86 (22.7%)	56 (24.8%)	36 (20.3%)
No	293 (77.3%)	152 (75.2%)	141 (79.7%)
Perforación intestinal			
Sí	61 (16.1%)	41 (20.3%)	20 (11.3%)
No	318 (83.9%)	161 (79.7%)	157 (88.7%)

* La invasión linfovascular se define como la presencia de invasión vascular y/o invasión linfática

1.2. TRATAMIENTO ADYUVANTE

Todos los pacientes fueron tratados con un esquema de QT adyuvante basado en oxaliplatino y fluoropirimidinas. En la cohorte de diseño 151 (74.8%) pacientes recibieron tratamiento con el esquema CAPOX y 51 (25.2%) con FOLFOX. Sin embargo, en la cohorte validación la mayoría de los pacientes fueron tratados con el esquema FOLFOX (155, 87.6%) (Figura 9).

Figura 9: Esquema de QT adyuvante en las dos cohortes



Resultados

No se objetivaron diferencias significativas en cuanto al régimen de QT utilizado en cada cohorte en función del estadio (Tabla 31).

Tabla 31: Esquema de QT en cada cohorte en función del estadio

ESQUEMA DE QUIMIOTERAPIA	C.DISEÑO (Nº pacientes, %)		C.VALIDACIÓN (Nº pacientes, %)	
	ESTADIO II	ESTADIO III	ESTADIO II	ESTADIO III
FOLFOX	14 (23.3%)	37 (26.1%)	40 (88.9%)	115 (87.1%)
CAPOX	46 (76.7%)	105 (73.9%)	5 (11.1%)	17 (12.9%)
TOTAL	60 (100%)	142 (100%)	45 (100%)	132 (100%)

En la cohorte de diseño se administró el tratamiento completo en 164 (81.2%) pacientes, con una media de 11.21 (2-12) ciclos en los casos tratados con FOLFOX y 7.61 (1-8) en aquellos tratados con CAPOX. En la cohorte de validación 144 (80.2%) pacientes recibieron el tratamiento previsto. Los pacientes tratados con FOLFOX recibieron una media de 11.29 ciclos (1-12) y aquellos tratados con CAPOX una media de 7.54 ciclos (3-8). No se objetivaron diferencias significativas entre ambas cohortes.

La dosis media acumulada de oxaliplatino fue de 961.2 mg/m² (130-1040) en la cohorte de diseño y 958.3 mg/m² (85-1040) en la cohorte de validación. Respecto al 5-fluorouracilo, la dosis media acumulada en la cohorte de diseño fue de 4478.43 mg/m² (800-4800) en el caso del bolus y de 6729 mg/m² (1200-7200) en el caso de la infusión continua. En la cohorte de validación, la dosis media acumulada de 5-fluorouracilo en bolus fue de 4518.7 mg/m² (400-4800) y de 5-fluorouracilo en infusión continua de 6778.06 mg/m² (600-7200). Finalmente, en el caso de la capecitabina, la dosis media acumulada en la cohorte de diseño fue de 15231.78 mg/m² (4000-16000) y de 15000 mg/m² en la cohorte de validación (2000-16000).

En la cohorte de diseño el tratamiento se interrumpió precozmente en 32 (15.8%) pacientes por toxicidad inaceptable, en 5 (2.5%) pacientes por recidiva o fallecimiento y en 1 (0.5%) paciente por retirada del consentimiento. En la cohorte de validación, 29 (16.4%) pacientes interrumpieron precozmente el tratamiento por toxicidad inaceptable y 4 (23.5%) por recidiva o fallecimiento.

1.3. POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO ÚNICO (SNP)

1.3.1. Frecuencias genotípicas

Las frecuencias genotípicas de una población se definen como la proporción o porcentaje de individuos con cada genotipo que está presente en la población.

$$\text{Frecuencia genotípica} = \frac{\text{Número de individuos con un genotipo}}{\text{Número total de individuos}}$$

Los tres genotipos posibles son:

- a) Homocigoto para el alelo nativo (P/P)
- b) Heterocigoto (P/Q)
- c) Homocigoto para el alelo mutado (Q/Q)

La suma de las frecuencias genotípicas es igual a 1

$$P/P + P/Q + Q/Q = 1$$

La Tabla 32 resume las frecuencias genotípicas de los polimorfismos estudiados en ambas cohortes. El porcentaje de resultados indeterminados en relación con las limitaciones del análisis de ADN en parafina osciló entre el 0.99% y el 8.91% en función del SNP.

Tabla 32: Frecuencias genotípicas de los polimorfismos estudiados

GEN	POLIMORFISMO	GENOTIPO	C. DISEÑO n=202 (n, %)	C. VALIDACIÓN n=177 (n, %)	TOTAL n=379 (n, %)
METABOLISMO Y DETOXIFICACIÓN DE FLUOROPIRIMIDINAS					
Timidilato sintetasa (TS)	rs34743033	2R/2R	105 (51.9)	92 (51.9)	197 (51.9)
		2R/3R	67 (33.2)	70 (39.6)	85 (22.4)
		3R/3R	12 (5.9)	11 (6.2)	23 (6.1)
		Indeterminado	18 (8.9)	4 (2.3)	22 (5.8)
	rs2244500	C/C	57 (28.2)	50 (28.3)	107 (28.2)
		C/T	95 (47)	82 (46.3)	177 (46.7)
		T/T	46 (22.8)	41 (23.2)	87 (22.9)
		Indeterminado	4 (2)	4 (2.3)	8 (2.1)

Resultados

GEN	POLIMORFISMO	GENOTIPO	C. DISEÑO n=202 (n, %)	C.VALIDACIÓN n=177 (n, %)	TOTAL n=379 (n, %)
METABOLISMO Y DETOXIFICACIÓN DE FLUOROPIRIMIDINAS					
Dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD)	rs3918290	G/G	179 (88.6)	158 (89.3)	337 (88.9)
		G/A	17 (8.4)	16 (9.1)	33 (8.7)
		A/A	1 (0.5)	0 (0)	1 (0.3)
		Indeterminado	5 (2.5)	3 (1.7)	8 (2.1)
	rs6663828	C/C	86 (42.6)	65 (36.7)	151 (39.8)
		C/T	88 (43.6)	87 (49.2)	175 (46.2)
		T/T	25 (12.4)	23 (13)	48 (12.6)
		Indeterminado	3 (1.5)	2 (1.1)	7 (1.9)
	rs970337	G/G	74 (36.6)	53 (29.9)	127 (33.5)
		G/A	94 (46.5)	88 (49.7)	182 (48)
		A/A	32 (15.8)	27 (15.3)	59 (15.6)
		Indeterminado	2 (1)	9 (5.1)	11 (2.9)
Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)	rs1801133	C/C	87 (43.1)	78 (44.1)	165 (43.5)
		C/T	84 (41.6)	75 (42.1)	159 (41.6)
		T/T	25 (12.4)	20 (11.3)	45 (11.9)
		Indeterminado	6 (3)	4 (2.3)	10 (2.6)
	rs1801131	A/A	109 (54)	99 (55.9)	208 (54.9)
		A/C	78 (38.6)	63 (35.6)	141 (37.2)
		C/C	13 (6.4)	11 (6.2)	24 (6.3)
		Indeterminado	2 (1)	4 (2.3)	6 (1.6)
	rs6541003	G/G	79 (39.1)	47 (26.6)	126 (33.3)
		G/A	89 (44.1)	98 (55.4)	187 (49.3)
		A/A	30 (14.9)	27 (15.3)	57 (15)
		Indeterminado	4 (2)	5 (2.8)	9 (2.4)
Orotato fosforibosiltransferasa (OPRT)	rs1801019	G/G	147 (72.7)	129 (72.8)	276 (72.8)
		G/C	47 (23.3)	41 (23.2)	88 (23.3)
		C/C	5 (2.5)	4 (2.3)	9 (2.4)
		Indeterminado	3 (1.5)	3 (1.7)	6 (1.6)
	rs3772807	G/G	103 (51)	87 (4.9)	190 (50.1)
		G/C	76 (37.6)	71 (40.1)	147 (38.8)
		C/C	15 (7.4)	13 (7.3)	28 (7.4)
		Indeterminado	8 (3)	6 (3.4)	14 (3.7)
METABOLISMO Y DETOXIFICACIÓN DE OXALIPLATINO/REPARACIÓN DEL ADN					
Glutation S-transferase pi 1 (GSTP1)	rs1695	C/C	87 (43.1)	78 (44.1)	165 (43.5)
		C/T	90 (44.6)	76 (42.9)	166 (43.8)
		T/T	21 (10.4)	18 (10.2)	39 (10.3)
		Indeterminado	4 (2)	5 (2.82)	9 (2.4)
	rs749174	C/C	92 (45.5)	69 (38.4)	161 (42.5)
		C/T	83 (41.1)	84 (47.5)	167 (44.1)
		T/T	20 (9.9)	18 (10.2)	38 (10)
		Indeterminado	7 (3.5)	6 (3.4)	13 (3.4)
Excision repair cross-complementing 1 (ERCC1)	rs11615	T/T	99 (49)	89 (50.3)	188 (49.6)
		C/T	80 (39.6)	69 (39)	149 (39.3)
		C/C	20 (9.9)	16 (9)	36 (9.5)
		Indeterminado	3 (1.5)	3 (1.7)	8 (1.6)
	rs3212964	G/G	140 (69.31)	129 (72.9)	269 (71)
		G/A	54 (26.7)	40 (22.6)	94 (24.8)
		A/A	5 (2.5)	3 (1.7)	8 (2.1)
		Indeterminado	3 (1.5)	5 (2.8)	8 (2.1)
Excision repair cross-complementing 2 (ERCC2/XPD)	rs1799793	G/G	96 (47.5)	80 (45.2)	176 (46.4)
		G/A	80 (39.6)	73 (41.2)	153 (40.4)
		A/A	24 (11.9)	20 (11.3)	44 (11.6)
		Indeterminado	2 (1)	4 (2.3)	6 (1.6)

GEN	POLIMORFISMO	GENOTIPO	C. DISEÑO n=202 (n, %)	C.VALIDACIÓN n=177 (n, %)	TOTAL n=379 (n, %)
METABOLISMO Y DETOXIFICACIÓN DE OXALIPLATINO/REPARACIÓN DEL ADN					
Excision repair cross-complementing 2 (ERCC2/XPD)	rs238404	A/A	59 (29.2)	50 (28.3)	109 (28.8)
		A/G	93 (46)	88 (49.7)	181 (47.8)
		G/G	42 (20.8)	36 (20.3)	78 (20.6)
		Indeterminado	8 (4)	3 (1.7)	11 (2.9)
	rs13181	T/T	95 (47)	83 (46.9)	178 (47)
		T/G	82 (40.6)	73 (41.2)	155 (40.9)
		G/G	23 (11.4)	17 (9.6)	40 (10.6)
		Indeterminado	2 (1)	4 (2.3)	6 (1.6)
Excision repair cross-complementing 5 (ERCC5/XPG)	rs4150279	T/T	60 (29.7)	66 (37.3)	126 (33.3)
		T/C	108 (53.5)	75 (42.4)	183 (48.3)
		C/C	31 (15.4)	27 (15.3)	58 (15.3)
		Indeterminado	3 (1.5)	9 (5.1)	12 (3.2)
	rs4150360	C/C	53 (26.2)	35 (19.8)	88 (23.2)
		C/T	97 (48)	100 (56.5)	197 (52)
		T/T	46 (22.8)	40 (22.6)	86 (22.7)
		Indeterminado	6 (3)	2 (1.1)	8 (2.1)
Excision repair cross-complementing 6 (ERCC6)	rs2228527	A/A	110 (55.5)	101 (57.1)	211 (55.7)
		A/G	73 (36.1)	61 (34.5)	134 (35.4)
		G/G	13 (6.4)	12 (6.8)	25 (6.6)
		Indeterminado	6 (3)	3 (1.7)	8 (2.4)
	rs7907557	T/T	56 (27.7)	54 (30.5)	110 (29)
		T/C	100 (49.5)	84 (47.5)	184 (48.6)
		C/C	42 (20.8)	35 (19.8)	77 (20.3)
		Indeterminado	4 (2)	4 (2.3)	8 (2.1)
X-ray cross-complementing group 1 (XRCC1)	rs25487	C/C	85 (42.1)	68 (38.4)	153 (40.4)
		C/T	89 (44.1)	83 (46.9)	172 (45.4)
		T/T	25 (12.4)	22 (12.4)	47 (12.4)
		Indeterminado	3 (1.5)	4 (2.3)	7 (1.9)
	rs25489	G/G	155 (76.7)	136 (76.8)	291 (76.8)
		G/A	36 (17.8)	34 (19.2)	70 (18.5)
		A/A	3 (1.5)	2 (1.1)	5 (1.3)
		Indeterminado	8 (4)	5 (2.8)	13 (3.4)
	rs12611088	G/G	98 (48.5)	85 (48)	183 (48.3)
		G/A	82 (40.6)	69 (39)	151 (39.8)
		A/A	20 (9.9)	19 (10.7)	39 (10.3)
		Indeterminado	2 (1)	4 (2.3)	6 (1.6)
	rs3213255	C/C	80 (39.6)	78 (44.1)	158 (41.7)
		C/T	93 (46)	73 (41.2)	166 (43.8)
		T/T	23 (11.4)	21 (11.9)	44 (11.6)
		Indeterminado	6 (3)	5 (2.8)	11 (2.9)
X-ray repair cross-complementing group 2 (XRCC 2)	rs3218536	G/G	160 (79.2)	144 (81.4)	304 (80.2)
		G/A	36 (17.8)	30 (17)	66 (17.4)
		A/A	2 (1)	1 (0.6)	3 (0.8)
		Indeterminado	4 (2)	2 (1.1)	6 (1.6)
	rs3218408	T/T	119 (58.9)	103 (5.8)	222 (58.6)
		T/G	70 (35.7)	62 (35)	132 (34.8)
		G/G	8 (4)	7 (3)	15 (4)
		Indeterminado	5 (2.5)	5 (2.8)	10 (2.6)
	rs3111471	T/T	111 (54)	90 (50.9)	201 (53)
		T/C	70 (34.6)	68 (38.4)	138 (36.4)
		C/C	11 (5.4)	10 (5.7)	21 (5.5)
		Indeterminado	10 (4)	9 (5.1)	19 (5)
RAD23 homólogo B (RAD23B)	rs10759225	A/A	106 (52.5)	93 (52.5)	199 (52.5)
		A/G	75 (37.1)	60 (33.9)	135 (35.6)
		G/G	18 (8.9)	15 (8.5)	33 (8.7)
		Indeterminado	3 (1.5)	8 (4.5)	11 (2.9)

Resultados

GEN	POLIMORFISMO	GENOTIPO	C. DISEÑO n=202 (n, %)	C.VALIDACIÓN n=177 (n, %)	TOTAL n=379 (n, %)
METABOLISMO Y DETOXIFICACIÓN DE OXALIPLATINO/REPARACIÓN DEL ADN					
RAD23 homólogo B (RAD23B)	rs2147072	G/G	97 (48)	89 (50.3)	186 (49.1)
		G/A	80 (39.6)	65 (36.7)	145 (38.3)
		A/A	20 (9.9)	18 (10.2)	38 (10)
		Indeterminado	5 (2.5)	5 (2.8)	10 (2.6)
	rs1805329	C/C	129 (63.9)	128 (72.3)	257 (67.8)
		C/T	50 (24.8)	35 (45.5)	85 (22.4)
		T/T	19 (9.4)	11 (6.2)	30 (7.9)
Metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT)	rs1803965	Indeterminado	4 (1.2)	3 (1.7)	7 (1.9)
		C/C	156 (77.2)	128 (72.3)	284 (74.9)
		C/T	40 (19.8)	37 (20.9)	77 (20.3)
		T/T	4 (2)	3 (1.3)	7 (1.8)
	rs656639	Indeterminado	2 (1)	9 (5.1)	11 (3)
		C/C	75 (37.1)	56 (31.6)	131 (34.6)
		C/G	94 (46.5)	92 (52)	186 (49.1)
		G/G	28 (13.9)	26 (14.7)	54 (14.3)
Xeroderma pigmentoso, grupo de complementación A (XPA)	rs3176639	Indeterminado	5 (24.8)	3 (1.7)	8 (2.1)
		C/C	98 (48.5)	75 (42.4)	173 (45.7)
		G/T	80 (39.6)	78 (44.1)	158 (41.7)
		T/T	21 (10.4)	19 (10.7)	40 (10.6)
	rs3176751	Indeterminado	3 (1.5)	5 (2.8)	8 (2.1)
		G/G	171 (84.7)	150 (84.8)	321 (84.7)
		G/C	28 (13.9)	18 (10.2)	46 (12.1)
		C/C	1 (0.5)	1 (0.6)	2 (0.5)
Xeroderma pigmentoso, grupo de complementación C (XPC)	rs2733534	Indeterminado	2 (1)	8 (4.5)	10 (2.6)
		G/G	89 (44.1)	69 (39)	158 (41.7)
		G/C	88 (43.6)	78 (44.1)	166 (43.8)
		C/C	20 (9.9)	23 (13)	43 (11.3)
		Indeterminado	5 (2.5)	7 (3.9)	12 (3.2)
VÍA DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGFR)					
Factor de crecimiento epidérmico (EGF)	rs6824594	G/G	79 (39.1)	57 (32.2)	136 (35.9)
		C/T	91 (45)	91 (51.4)	182 (48)
		T/T	27 (13.4)	23 (13)	50 (13.2)
		Indeterminado	5 (2.5)	6 (3.4)	11 (2.9)
	rs929446	T/T	66 (32.7)	63 (35.6)	129 (34.1)
		T/C	101 (50)	80 (45.2)	181 (47.8)
		C/C	30 (14.9)	26 (14.7)	56 (14.7)
Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)	rs1543848	Indeterminado	5 (2.4)	8 (4.5)	13 (3.4)
		G/G	107 (54.5)	93 (52.5)	200 (52.8)
		G/A	78 (38.1)	62 (35)	140 (36.9)
		A/A	14 (5.9)	13 (7.4)	27 (7.1)
		Indeterminado	3 (1.5)	9 (5.1)	12 (3.2)
Homólogo 1 del oncogene viral del timoma murino (AKT1)	rs3803304	G/G	103 (51)	86 (48.6)	189 (49.9)
		G/C	80 (39.6)	72 (40.7)	152 (40.1)
		C/C	15 (7.4)	12 (6.8)	27 (7.1)
		Indeterminado	4 (2)	7 (3.9)	11 (2.9)
	rs10142069	T/T	116 (57.4)	96 (54.2)	212 (55.9)
		C/T	70 (34.7)	56 (31.6)	126 (33.3)
		T/T	11 (5.5)	14 (7.9)	25 (6.6)
		Indeterminado	5 (2.4)	11 (6.3)	16 (4.2)
	rs3001371	C/C	100 (49.5)	74 (41.8)	174 (45.9)
		C/T	76 (37.6)	80 (45.2)	156 (41.2)
T/T		20 (9.9)	17 (9.6)	37 (9.8)	
Indeterminado		6 (3)	6 (3.4)	12 (3.1)	

GEN	POLIMORFISMO	GENOTIPO	C. DISEÑO n=202 (n, %)	C. VALIDACIÓN n=177 (n, %)	TOTAL n=379 (n, %)
VÍA DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGFR)					
Homólogo 2 del oncogene viral del timoma murino (AKT2)	rs2304186	G/G	63 (31.2)	46 (25)	109 (28.8)
		G/T	93 (46)	88 (49.7)	181 (47.8)
		T/T	42 (20.8)	37 (20.9)	79 (20.8)
		Indeterminado	4 (2)	6 (3.4)	10 (2.6)
	rs7260517	G/G	101 (50)	94 (53.1)	195 (51.5)
		G/A	82 (40.6)	64 (36.2)	146 (38.6)
		A/A	14 (6.9)	11 (6.2)	25 (6.6)
	Indeterminado	5 (2.5)	8 (4.5)	13 (34.3)	
ANGIOGÉNESIS					
Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)	rs833070	G/G	52 (25.7)	56 (31.6)	108 (28.5)
		G/A	108 (53.5)	79 (44.6)	187 (49.3)
		A/A	39 (19.3)	34 (19.2)	73 (19.3)
		Indeterminado	3 (1.5)	8 (4.5)	11 (2.9)
	rs3025039	C/C	147 (72.8)	138 (78)	285 (75.2)
		C/T	47 (23.3)	33 (16.3)	80 (21.1)
		T/T	3 (1.5)	2 (1.1)	5 (1.3)
	Indeterminado	5 (2.5)	4 (2.3)	9 (2.4)	
Interleuquina 8 (IL-8)	rs4073	A/A	68 (33.7)	58 (32.8)	126 (33.2)
		A/T	93 (46)	81 (45.8)	174 (45.9)
		T/T	35 (17.3)	30 (17)	65 (17.2)
		Indeterminado	6 (3)	8 (4.5)	14 (3.7)
	rs2227306	G/G	80 (39.6)	60 (33.9)	140 (36.9)
		G/A	83 (41.1)	85 (48)	168 (44.3)
		A/A	29 (14.3)	25 (14.1)	54 (14.3)
	Indeterminado	10 (5)	7 (4)	17 (4.5)	
TRANSPORTE Y METABOLISMO DE FÁRMACOS					
Transportador ATP-binding cassette subfamilia G, miembro 1 (ABCB1)	rs1045642	C/C	87 (43.1)	68 (38.4)	155 (40.9)
		C/T	73 (36.1)	76 (43)	149 (39.3)
		T/T	35 (17.3)	28 (15.8)	63 (16.6)
		Indeterminado	7 (3.5)	5 (2.8)	12 (3.2)
Transportador ATP-binding cassette subfamilia G, miembro 2 (ABCG2)	rs2231142	C/C	164 (81.2)	142 (80.2)	306 (80.7)
		C/A	33 (16.3)	29 (16.4)	62 (16.4)
		A/A	3 (1.5)	2 (1.1)	5 (1.3)
		Indeterminado	2 (1)	4 (2.3)	6 (1.6)
	rs2728124	C/C	83 (41.1)	79 (44.6)	162 (42.7)
		C/T	90 (44.5)	72 (40.7)	162 (42.7)
		T/T	26 (12.9)	23 (13)	49 (12.9)
		Indeterminado	3 (1.5)	3 (1.7)	6 (1.6)
	rs3114018	A/A	48 (23.8)	48 (27.1)	96 (25.3)
		A/C	106 (52.5)	87 (49.2)	193 (50.9)
		C/C	42 (20.8)	37 (20.9)	79 (20.8)
		Indeterminado	6 (3)	5 (2.8)	11 (2.9)
Sulfotransferasa 1A1 (SULT1A1)	rs1968752	C/C	98 (48.5)	89 (50.3)	187 (49.3)
		C/A	81 (40)	66 (37.3)	147 (38.8)
		A/A	14 (6.9)	14 (7.9)	28 (7.4)
		Indeterminado	9 (4.5)	8 (4.5)	17 (4.5)
ADHESIÓN E INVASIVIDAD CELULAR					
E-selectina (SELE)	rs5361	T/T	162 (80.2)	142 (80.2)	304 (80.2)
		T/G	32 (15.8)	29 (16.4)	61 (16.1)
		G/G	2 (1)	1 (0.6)	3 (0.8)
		Indeterminado	6 (3)	5 (2.8)	11 (2.9)

Resultados

GEN	POLIMORFISMO	GENOTIPO	C.DISEÑO n=202 (n, %)	C.VALIDACIÓN n=177 (n, %)	TOTAL n=379 (n, %)
ADHESIÓN E INVASIVIDAD CELULAR					
E-selectina (SELE)	rs3917412	G/G	112 (55.5)	94 (53.1)	206 (54.4)
		G/A	75 (37.1)	69 (39)	144 (38)
		A/A	11 (5.5)	10 (5.7)	21 (5.6)
		Indeterminado	4 (2)	4 (2.3)	8 (2.1)
	rs3917436	C/C	95 (47)	85 (48)	180 (47.5)
		C/T	82 (40.6)	70 (39.6)	152 (40.1)
		T/T	19 (9.4)	16 (9)	35 (9.2)
		Indeterminado	6 (3)	6 (3.4)	12 (3.2)
Molécula de adhesión intercellular (ICAM1)	rs3093030	C/C	66 (32.7)	64 (36.2)	130 (34.3)
		C/T	95 (47)	76 (42.9)	171 (45.1)
		T/T	37 (18.3)	33 (18.6)	70 (18.5)
		Indeterminado	4 (2)	4 (2.3)	8 (2.1)
Metaloproteinasa de matriz 1 (MMP1)	rs498186	A/A	70 (34.7)	49 (27.7)	119 (31.4)
		A/C	91 (45)	90 (50.9)	181 (47.8)
		C/C	37 (18.3)	32 (18.1)	69 (18.2)
		Indeterminado	4 (2)	6 (3.4)	10 (2.6)
Metaloproteinasa de matriz 3 (MMP3)	rs602128	C/C	53 (26.2)	49 (27.7)	102 (26.9)
		C/T	102 (50.5)	83 (46.9)	185 (48.8)
		T/T	41 (20.3)	36 (20.3)	77 (20.3)
		Indeterminado	6 (3)	9 (5.1)	15 (4)
OTROS					
Ciclina H (CCNH)	rs2230641	T/T	129 (63.9)	116 (65.6)	245 (64.6)
		T/C	63 (31.2)	51 (28.8)	114 (30.1)
		C/C	7 (3.4)	6 (3.4)	13 (3.43)
		Indeterminado	3 (1.5)	4 (2.2)	7 (1.9)
	rs3093816	T/T	83 (41.1)	65 (36.7)	148 (39.1)
		T/C	87 (43)	86 (48.6)	173 (45.7)
		C/C	28 (13.9)	24 (13.6)	52 (13.7)
		Indeterminado	4 (2)	2 (1.1)	6 (1.5)
Receptor del factor de crecimiento insulínico (IGFR-1)	rs2229765	G/G	75 (37.1)	62 (35)	137 (36.2)
		G/A	91 (45)	82 (46.3)	173 (45.6)
		A/A	30 (14.9)	28 (15.8)	58 (15.3)
		Indeterminado	6 (3)	5 (2.9)	11 (2.9)
	rs939626	T/T	58 (28.7)	40 (22.6)	108 (28.5)
		T/C	94 (46.5)	95 (53.7)	189 (49.9)
		C/C	44 (21.8)	39 (22)	83 (21.9)
		Indeterminado	6 (3)	3 (1.7)	9 (2.4)
Mechanistic target of ramaycin (mTOR)	rs2295080	G/G	98 (48.5)	86 (48.6)	184 (48.5)
		G/T	77 (38.1)	70 (39.6)	147 (38.8)
		T/T	19 (9.4)	15 (8.4)	34 (9)
		Indeterminado	8 (4)	6 (3.4)	14 (3.7)
	rs357278	A/A	68 (33.7)	62 (35)	130 (34.3)
		A/C	97 (48)	83 (46.9)	180 (47.5)
		C/C	35 (17.3)	30 (17)	65 (17.2)
		Indeterminado	2 (1)	2 (1.1)	4 (1)
	rs6895953	G/G	65 (32.2)	64 (36.1)	129 (34)
		G/A	100 (49.5)	80 (45.2)	180 (47.5)
		A/A	35 (17.3)	30 (17)	65 (17.2)
		Indeterminado	2 (1)	3 (1.7)	5 (1.3)
LSM3 homólogo asociado a RNA nuclear U6 (LSM3)	rs11615	C/C	87 (43.1)	65 (36.7)	152 (40.1)
		C/T	81 (40.1)	82 (46.3)	163 (43)
		T/T	25 (12.4)	22 (12.4)	47 (12.4)
		Indeterminado	9 (4.4)	8 (4.6)	17 (4.5)

1.3.2. Frecuencias génicas o alélicas. Equilibrio de Hardy-Weinberg

Las frecuencias alélicas se definen como la proporción o porcentaje de los diferentes alelos en cada locus presente en la población. La suma de las frecuencias alélicas es 1. Se pueden calcular a partir de las frecuencias genotípicas conociendo el tamaño de la muestra (N) mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Frecuencia del alelo } P = \frac{(PP + \frac{1}{2}PQ)}{PP + PQ + QQ}$$

$$\text{Frecuencia del alelo } Q = \frac{(QQ + \frac{1}{2}PQ)}{PP + PQ + QQ}$$

La Ley de Hardy-Weinberg se define mediante el siguiente enunciado: “En una población panmítica (aquella en la que los apareamientos son aleatorios), suficientemente grande y no sometida a migración, mutación, deriva génica o selección, las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de generación en generación”. Cuando se cumplen estas condiciones se dice que la población está en equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW).

En el estudio se calcularon las frecuencias alélicas de los distintos SNP a partir de las frecuencias genotípicas observadas en ambas cohortes y se compararon con las frecuencias alélicas esperadas según las bases de datos referidas previamente mediante un test de X^2 . Procediendo de esta manera, se confirmó que las frecuencias alélicas de todos los SNP se encontraban en EHW con respecto a las reportadas previamente en la literatura, con la excepción de RAD23B rs1805329 en ambas cohortes.

Finalmente, el genotipado de los SNPs en el tejido peritumoral pudo llevarse a cabo en el 78% de los pacientes incluidos en la cohorte de diseño y en el 72% de los incluidos en la cohorte de validación. En el 95-99% de los SNPs analizados se evidenció concordancia entre los genotipos encontrados en las muestras tumorales y la mucosa normal adyacente.

2. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

2.1. SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD (SLE)

La mediana de seguimiento fue de 62.4 meses (rango, 7-106) en la cohorte de diseño y de 60.7 meses (rango, 11-98) en la de validación.

En la cohorte de diseño, 64 (31.7%) pacientes experimentaron una recidiva de la enfermedad. Cuatro (6.3%) recaídas fueron exclusivamente locales, 58 (90.6%) a distancia y 2 (3.1%) pacientes experimentaron una recidiva tanto local como a distancia. Las localizaciones metastásicas más frecuentes fueron: hígado (73.3%), pulmón (53.3%), peritoneo (48.3%), adenopatías a distancia (29.7%) y otras (20%). La SLE media fue 70.8 meses [intervalo de confianza (IC) 95%, 65.6-75.9] y la SLE a los 3 años 72.3% (IC 95%, 67.1%-75.4%). No se alcanzó la SLE mediana.

En la cohorte de validación, 49 (27.7%) pacientes presentaron una recaída de la enfermedad, 2 (4.1%) de las cuales fueron locales, 46 (93.9%) a distancia y 1 (2%) local y a distancia. De forma similar a lo que ocurre en la cohorte de diseño, el hígado fue la localización metastásica más frecuente (81.6%), seguida del peritoneo (53.1%), adenopatías a distancia (30.6%), metástasis pulmonares (28.6%) y otras. La SLE media fue 65.2 meses (IC 95%, 58.7-67.7) y la SLE a los 3 años 76.5% (IC 95%, 73.3%-79.8%). Tampoco se alcanzó la mediana de SLE.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar las curvas de SLE de ambas cohortes por el método de Kaplan-Meier (Figura 10), con un valor de $p=0.63$ al aplicar el test log-rank.

2.2. SUPERVIVENCIA GLOBAL (SG)

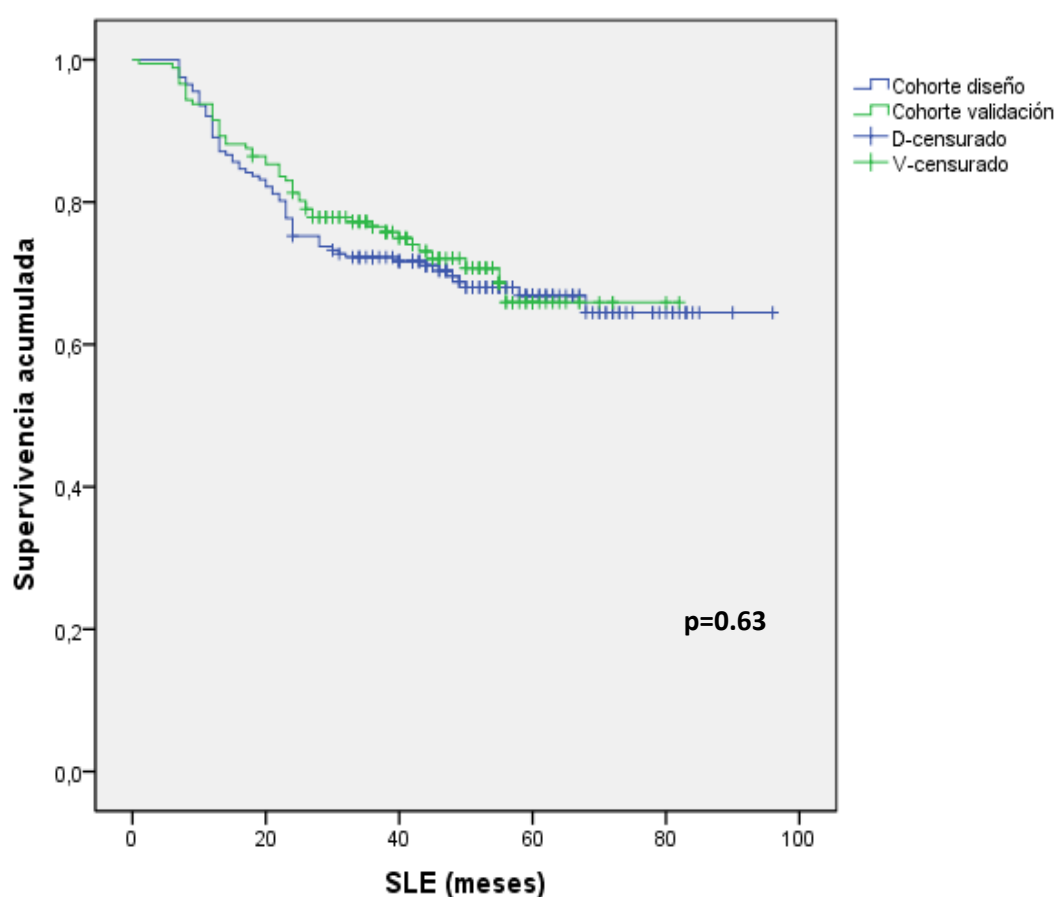
En la cohorte de diseño, fallecieron 31 (15.3%) pacientes, 27 (87.1%) de ellos como consecuencia de la progresión de la enfermedad neoplásica de base, 2 (6.5%) por toxicidad asociada al tratamiento y otros 2 (6.5%) por otra causa no relacionada con el tumor. La SG media fue 84.1 meses (IC 95%, 80.3-88) y la SG a los 3 años 89.1% (IC 95%, 86.9%-91.3%). No se alcanzó la mediana de SG

En la cohorte de validación, tuvieron lugar 27 (15.3%) fallecimientos, 24 (88.8%) como consecuencia de la progresión del CC, 2 (7.4%) debido a la toxicidad de la CT adyuvante o la administrada en el momento de la recidiva y 1 (3.7%) paciente por otra causa no relacionada con el tumor. La SG media fue 81.7 meses (IC 95%, 78.1-85.4) y

la SG a los 3 años 89.7% (IC 95%, 87.4%-90%). Tampoco se alcanzó la mediana de SG.

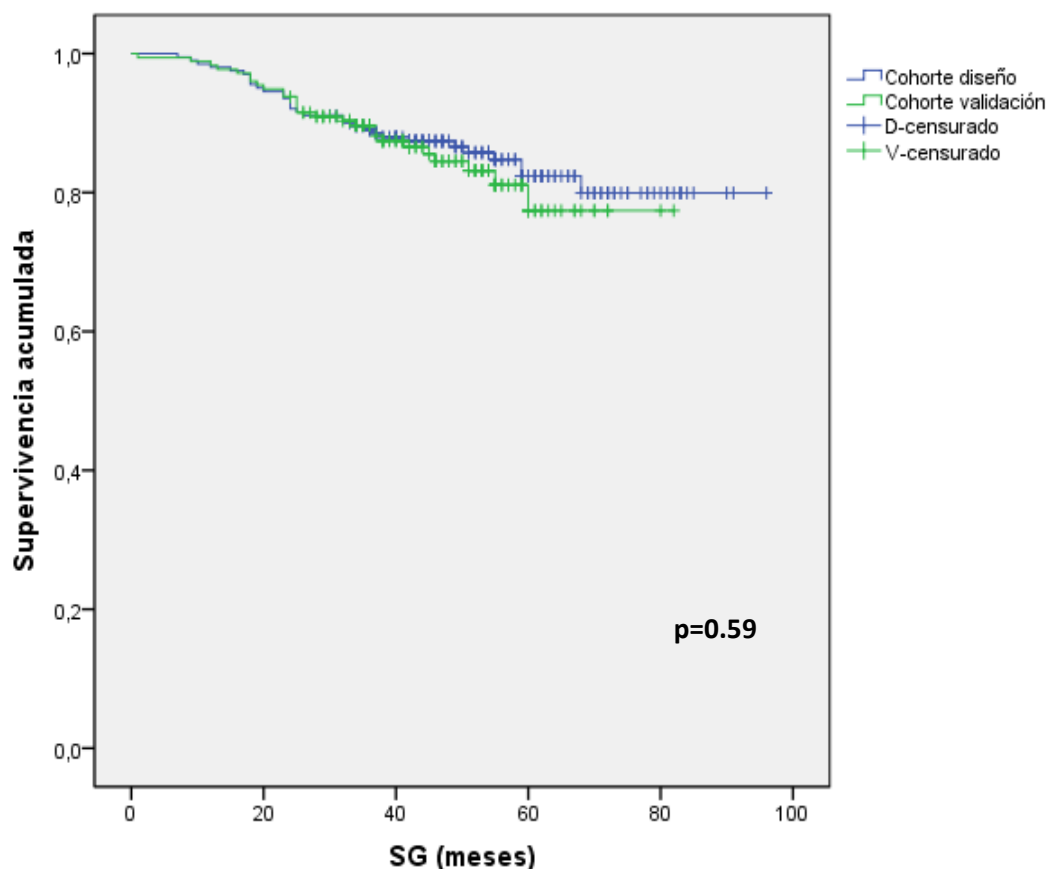
La Figura 11 muestra las curvas de SG por el método de Kaplan-Meier. Al igual que ocurre con la SLE, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas cohortes, obteniéndose un valor de $p=0.59$ cuando se aplica el test log-rank.

Figura 10: SLE en las cohortes de diseño y de validación



Resultados

Figura 11: SG en las cohortes de diseño y de validación



2.3. ANÁLISIS DE LA SLE y LA SG EN FUNCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y EL TRATAMIENTO

Mediante regresión de Cox se realizó un análisis univariante para estudiar la potencial asociación entre las diferentes características clínico-patológicas o el tratamiento y la supervivencia de los pacientes en ambas cohortes. Las variables que se consideraron en dicho análisis fueron la edad, el sexo, la localización tumoral, el grado de diferenciación, el estadio, la invasión vascular, la invasión linfática, la invasión perineural, la presencia de obstrucción o perforación intestinal al diagnóstico, el valor de CEA preoperatorio y el esquema de QT adyuvante empleado. Posteriormente, se llevó a cabo un análisis multivariante en el que se incluyeron aquellas características para las que se había encontrado una asociación estadísticamente significativa con la supervivencia en el univariante.

2.3.1. Cohorte de diseño

2.3.1.1. Supervivencia libre de enfermedad

En la cohorte de diseño, las variables para las que se encontró una asociación estadísticamente significativa con la SLE en el análisis univariante fueron el estadio III, la presencia de invasión vascular, linfática, linfovascular o perineural y la perforación intestinal al diagnóstico (Tabla 33)

El estadio III, la invasión linfovascular y la perforación intestinal mantuvieron su valor pronóstico independiente en el análisis multivariante (Tabla 33).

Tabla 33: Asociación de las variables clínico-patológicas y terapéuticas con la SLE en la cohorte de diseño

VARIABLE	UNIVARIANTE			MULTIVARIANTE		
	HR	IC 95%	P	HR	IC 95%	P
Edad	1.01	0.99-1.03	0.337	1.02	0.93-1.13	0.44
Sexo	1.07	0.65-1.76	0.778	0.98	0.61-1.82	0.81
Localización tumoral	1.09	0.92-1.28	0.332	1.13	0.89-1.32	0.44
Grado de diferenciación	0.96	0.55-1.68	0.887	1.003	0.53-1.89	0.99
Estadio	3.34	1.59-7.01	0.001	3.98	1.83-8.66	0.001
Invasión vascular	2.06	1.25-3.39	0.004	1.23	0.91-5.82	0.08
Invasión linfática	2.73	1.66-4.51	0.001	3.11	0.89-6.01	0.08
Invasión linfovascular	2.28	1.36-3.81	0.002	2.26	1.1-4.64	0.03
Invasión perineural	2.411	1.47-3.95	0.001	1.32	0.58-2.99	0.51
Obstrucción intestinal	1.21	0.69-2.09	0.52	1.41	0.63-2.13	0.61
Perforación intestinal	2.32	1.74-3.35	0.03	1.64	1.03-3.36	0.042
CEA preoperatorio	1.01	0.99-1.03	0.06	1.001	0.92-1.15	0.08
Esquema de QT	1.48	0.86-2.53	0.15	1.88	0.91-2.87	0.18

2.3.1.2. Supervivencia global

Al igual que en el caso de la SLE, en el análisis univariante se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la SG y el estadio III, la invasión vascular, linfática, linfovascular y perineural y la perforación intestinal (Tabla 34).

Resultados

En el análisis multivariante se mantuvo la significación estadística en el caso del estadio III y de la invasión linfovascular (Tabla 34).

Tabla 34: Asociación de las variables clínico-patológicas y terapéuticas con la SG en la cohorte de diseño.

VARIABLE	UNIVARIANTE			MULTIVARIANTE		
	HR	IC 95%	P	HR	IC 95%	P
Edad	1.02	0.98-1.05	0.32	1.1	0.91-1.07	0.41
Sexo	0.93	0.46-1.89	0.84	0.86	0.87-1.92	0.91
Localización tumoral	1.26	0.42-3.77	0.68	1.2	1.41-4.11	0.71
Grado de diferenciación	1.68	0.88-2.32	0.23	1.72	0.78-2.68	0.32
Estadio	4.18	1.27-13.74	0.02	5.01	1.44-17.37	0.01
Invasión vascular	3.32	1.56-7.07	0.002	1.9	0.62-8.58	0.21
Invasión linfática	4.001	1.93-8.27	0.001	1.77	0.29-10.87	0.24
Invasión linfovascular	3.89	1.73-8.75	0.001	3.08	1.16-8.22	0.02
Invasión perineural	2.05	1.09-4.17	0.047	2.06	0.92-4.19	0.08
Obstrucción intestinal	1.67	0.78-3.54	0.186	1.88	0.82-3.68	0.21
Perforación intestinal	1.91	1.04-9.87	0.048	1.81	0.88-3.93	0.09
CEA preoperatorio	1.01	0.99-1.03	0.13	1.11	0.9-1.07	1.15
Esquema de QT	1.36	0.63-2.97	0.44	1.46	0.67-3.01	0.77

2.3.2. Cohorte de validación

2.3.2.1. Supervivencia libre de enfermedad

En el caso de la cohorte de validación, en el análisis univariante se demostró una asociación estadísticamente significativa entre la SLE y el estadio III, la invasión vascular, linfática, linfovascular y perineural, así como la obstrucción y la perforación intestinal (Tabla 35).

En el análisis multivariante la invasión linfovascular y perineural y la perforación intestinal mantuvieron su valor pronóstico independiente, mientras que la asociación con el estadio se encontraba en el límite de la significación estadística (Tabla 35).

Tabla 35: Asociación de las variables clínico-patológicas y terapéuticas con la SLE en la cohorte de validación

VARIABLE	UNIVARIANTE			MULTIVARIANTE		
	HR	IC 95%	P	HR	IC 95%	P
Edad	1.02	0.99-1.05	0.16	1.18	0.89-1.68	0.27
Sexo	1.21	0.68-2.13	0.52	1.16	0.6-2.32	0.68
Localización tumoral	1.16	0.94-1.44	0.16	1.04	0.88-1.88	0.23
Grado de diferenciación	1.11	0.69-1.76	0.68	1.09	0.79-1.87	0.77
Estadio	1.91	1.08-5.97	0.04	2.14	0.99-4.73	0.053
Invasión vascular	3.56	2.01-6.31	0.001	2.44	0.95-10.51	0.06
Invasión linfática	3.94	2.16-7.16	0.001	1.99	0.91-11.98	0.06
Invasión linfovascular	5.07	2.59-9.93	0.001	3.78	1.04-13.67	0.04
Invasión perineural	10.01	5.43-18.48	0.001	10.65	4.69-24.17	0.001
Obstrucción intestinal	2.13	1.17-6.78	0.013	1.46	0.74-6.88	0.09
Perforación intestinal	3.57	1.88-3.12	0.001	2.38	1.18-4.83	0.02
CEA preoperatorio	1.35	0.87-3.12	0.41	1.19	0.8-1.17	0.49
Esquema de QT	0.86	0.39-1.92	0.71	1.91	0.44-2.45	0.68

2.3.2.2. Supervivencia global

Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la SG y la invasión vascular, linfática, linfovascular o perineural y la perforación intestinal en el análisis univariante. La asociación con el estadio se encontraba en el límite de la significación estadística (Tabla 36)

En el análisis multivariante se mantuvo la significación estadística sólo en el caso de la invasión linfovascular y perineural (Tabla 36).

Resultados

Tabla 36: Asociación de las variables clínico-patológicas y terapéuticas con la SG en la cohorte de validación

VARIABLE	UNIVARIANTE			MULTIVARIANTE		
	HR	IC 95%	P	HR	IC 95%	P
Edad	1.03	0.98-1.08	0.16	1.09	0.85-1.32	0.32
Sexo	0.96	0.45-2.03	0.91	1.01	0.32-2.15	1.99
Localización tumoral	2.58	0.35-19.27	0.17	2.66	0.3-22.55	0.22
Grado de diferenciación	1.23	0.76-3.24	0.37	1.45	0.65-4.23	0.45
Estadio	2.06	0.99-9.67	0.051	1.36	0.88-3.71	0.14
Invasión vascular	4.06	1.9-8.67	0.001	2.99	0.87-9.96	0.16
Invasión linfática	4.18	1.83-9.56	0.001	2.68	0.88-12.52	0.19
Invasión linfovascular	5.82	2.2-15.38	0.001	4.88	2.19-11.82	0.03
Invasión perineural	12.72	5.13-31.59	0.001	2.26	0.99-13.48	0.02
Obstrucción intestinal	1.54	0.09-10.99	0.23	1.38	0.13-12.33	0.32
Perforación intestinal	2.5	1.1-5.97	0.04	2.51	1.11-5.97	0.14
CEA preoperatorio	1.09	0.76-4.75	0.65	1.12	0.66-5.61	0.71
Esquema de QT	0.85	0.29-2.45	0.76	0.95	0.87-3.25	0.81

2.4. ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD EN FUNCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO ÚNICO

Inicialmente se analizó la posible asociación entre los SNPs y la SLE mediante un modelo de Cox univariante. Posteriormente, se empleó un modelo de regresión múltiple para evaluar la posible implicación pronóstica independiente de los SNP relevantes con respecto a la SLE, utilizando los resultados clínico-patológicos significativos como covariables.

2.4.1. Cohorte de diseño

En la cohorte de diseño se encontró una asociación estadísticamente significativa entre los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T y la SLE en el análisis univariante, así como en el análisis multivariante utilizando el estadio, la invasión linfovascular y la perforación intestinal como covariables.

A) SELE rs3917412 G>A

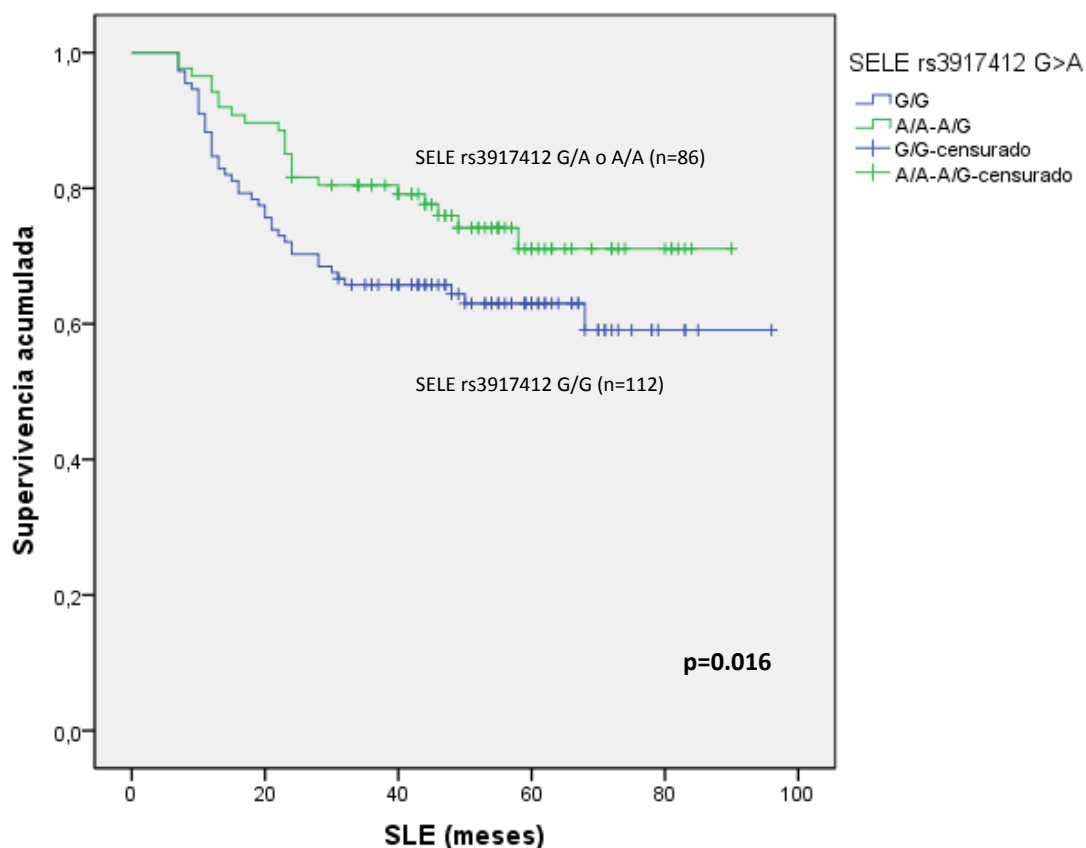
Con respecto al SNP SELE rs3917412 G>A, 112 (55.5%) pacientes fueron portadores homocigotos del alelo nativo G (G/G), 75 (37.1%) heterocigotos (G/A) y 11 (5.5%) portadores homocigotos del alelo mutado A (A/A). La SLE a los 3 años en los pacientes con el genotipo G/G fue 67.6% (IC 95%, 63.2%-72%), significativamente inferior a la de los portadores heterocigotos u homocigotos del alelo mutado A (G/A o A/A) (80.4%; IC 95%, 76.1%-84.7%) (HR=0.52; IC 95%, 0.31-0.88; p=0.016) (Tabla 37). La Figura 12 muestra las curvas de SLE según los genotipos de dicho SNP.

Tabla 37: Análisis uni y multivariante de la asociación entre el SNP SELE rs3917412 G>A y la SLE en la cohorte de diseño

VARIABLE	N (%)	HR	IC 95%		P
			Superior	Inferior	
UNIVARIANTE					
SELE rs3917412 G>A					
G/G	112 (55.45)	1(Referencia)			
G/A-A/A	86 (42.58)	0.79	0.61	0.98	0.046
MULTIVARIABLE					
SELE rs3917412 G>A					
G/G	112 (55.45)	1(Referencia)			
G/A-A/A	86 (42.58)	0.52	0.31	0.88	0.016
Estadio					
II	60 (29.7)	1(Referencia)			
III	142 (70.3)	4.07	1.87	8.86	0.001
Invasión linfovascular					
No	104 (51.49)	1(Referencia)			
Sí	98 (48.51)	2.35	1.39	3.94	0.001
Perforación intestinal					
No	161 (79.71)	1(Referencia)			
Sí	41 (20.3)	1.659	0.89	3.11	0.11

Resultados

Figura 12: SLE en función del SNP SELE rs3917412 G>A en la cohorte de diseño



B) MTHFR rs1801133 C>T

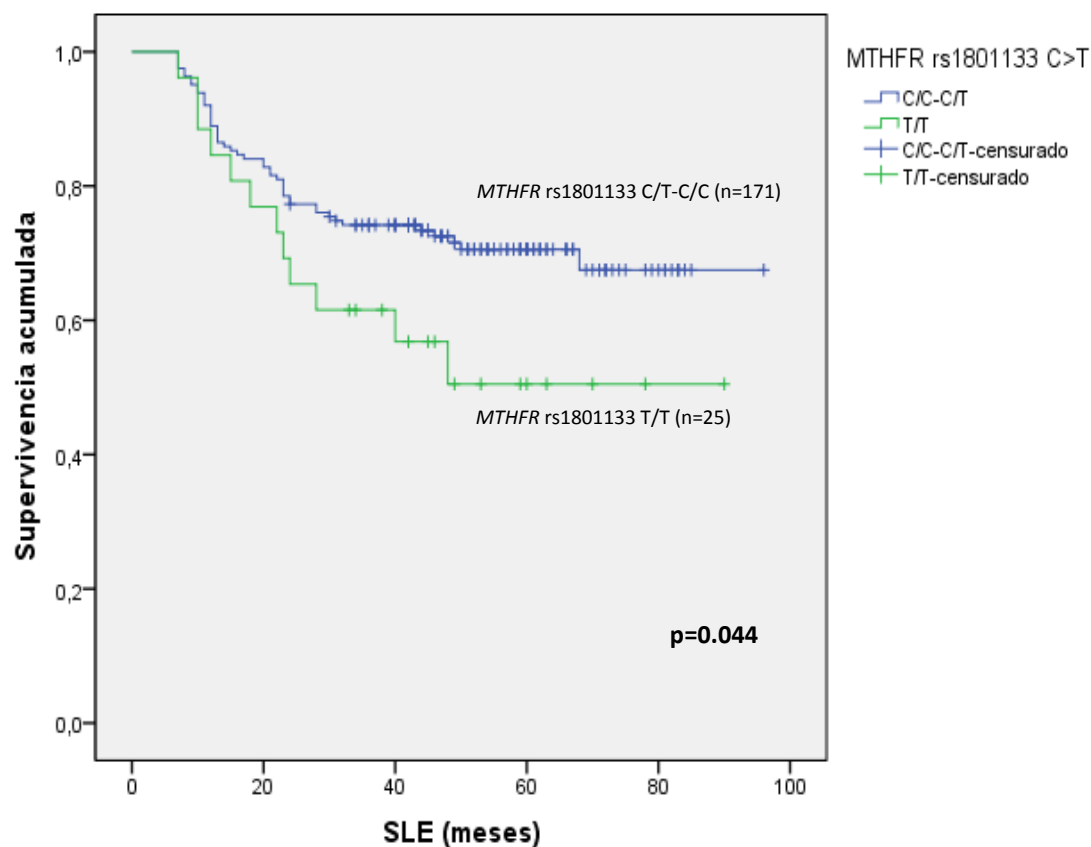
En el caso del SNP MTHFR rs1801133 C>T, se encontraron 87 (43.1%) pacientes homocigotos para el alelo nativo C (C/C), 84 (41.6%) heterocigotos (C/T) y 25 (12.3%) homocigotos para el alelo mutado T (T/T). Los pacientes con el genotipo homocigoto T/T presentaron un riesgo de recaída significativamente superior que aquellos heterocigotos u homocigotos para el alelo C (C/T o C/C). Así, la SLE a los 3 años fue 61.5% (IC 95%, 52%-71%) en los portadores del genotipo T/T y 74.2% (IC 95%, 70.8%-77.4%) en los portadores de los genotipos C/T o C/C (HR=1.92; IC 95%, 1.03-3.63; p=0.044) (Tabla 38). Las curvas de SLE en función de los genotipos del SNP MTHFR rs1801133 se representan en la Figura 13.

Tabla 38: Análisis uni y multivariante de la asociación entre el SNP MTHFR rs1801133 C>T y la SLE en la cohorte de diseño

VARIABLE	N (%)	HR	IC 95%		P
			Superior	Inferior	
UNIVARIABLE					
MTHFR 1801133 C>T					
C/C-C/T	171 (84.65)	1(Referencia)			
T/T	25 (12.38)	1.95	1.08	3.31	0.042
MULTIVARIABLE					
MTHFR 1801133 C>T					
C/C-C/T	171 (84.65)	1(Referencia)			
T/T	25 (12.38)	1.92	1.03	3.63	0.044
Estadio					
II	60 (29.7)	1(Referencia)			
III	142 (70.3)	3.41	1.58	7.35	0.002
Invasión linfovascular					
No	104 (51.49)	1(Referencia)			
Sí	98 (48.51)	1.98	1.17	3.37	0.012
Perforación intestinal					
No	161 (79.71)	1(Referencia)			
Si	41 (20.3)	1.77	0.93	3.36	0.081

Resultados

Figura 13: SLE en función del SNP MTHFR rs1801133 C>T en la cohorte de diseño



C) Combinación SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T

Finalmente, se analizó la posible interacción entre la SLE y la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T. Un total de 71 (35.2%) pacientes presentaron los genotipos SELE G/A-A/A y MTHFR C/T-C/C, 100 (49.5%) los genotipos SELE G/A-A/A y/o MTHFR C/T-C/C y 15 (7.4%) pacientes los genotipos SELE G/G y MTHFR T/T. En la evaluación conjunta se objetivó un riesgo de recidiva significativamente superior en los pacientes con los genotipos SELE G/G y MTHFR T/T que en aquellos portadores los genotipos SELE G/A-A/A y/o MTHFR C/T-C/C tanto en el análisis univariante como en el multivariante considerando el estadio, la invasión linfovascular y la perforación intestinal como covariantes (Tabla 39). Así, la SLE a los 3 años fue 46.7% (IC 95%, 33.8%-59.6%) para los portadores de los genotipos SELE G/G y MTHFR T/T, 71% (IC 95%, 66.5%-75.5%) para los portadores

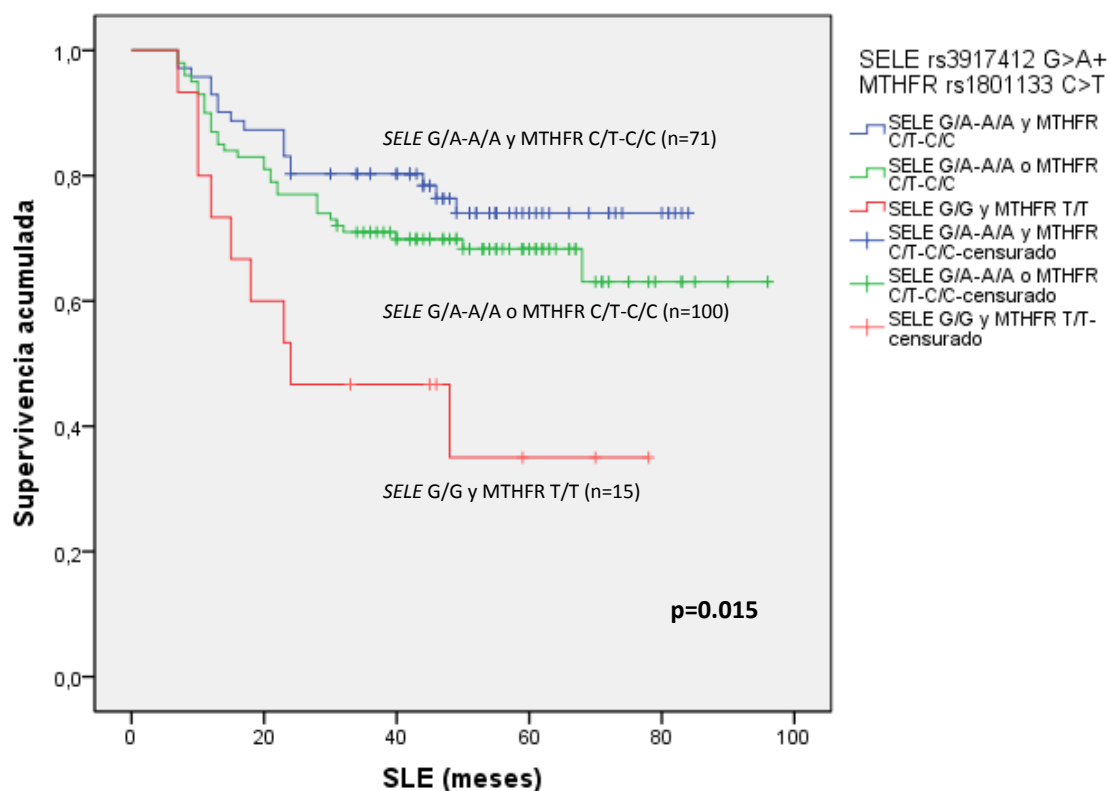
de los genotipos SELE G/A-A/A o MTHFR C/T-C/C y 76.4% (IC 95%, 71.2%-81.6%) para aquellos con los genotipos SELE G/A-A/A o MTHFR C/T-C/C (Figura 14).

Tabla 39: Análisis uni y multivariante de la asociación entre la SLE y la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en la cohorte de diseño

VARIABLE	N (%)	HR	IC 95%		P
			Superior	Inferior	
UNIVARIABLE					
SELE rs3917412 G>A + MTHFR rs1801133 C>T					0.018
SELE G/A-A/A y MTHFR C/T-C/C	71 (35.2)	1 (Referencia)			
SELE G/A-A/A o MTHFR C/T-C/C	100 (49.5)	1.86	1.05	2.96	0.047
SELE G/G y MTHFR T/T	15 (7.4)	3.56	1.51	8.45	0.004
MULTIVARIABLE					
SELE rs3917412 G>A + MTHFR rs1801133 C>T					0.015
SELE G/A-A/A y MTHFR C/T-C/C	71 (35.2)	1 (Referencia)			
SELE G/A-A/A o MTHFR C/T-C/C	100 (49.5)	1.87	1.03	2.54	0.049
SELE G/G y MTHFR T/T	15 (7.4)	3.28	1.46	7.37	0.004
Estadio					
II	60 (29.7)	1 (Referencia)			
III	142 (70.3)	3.38	1.55	7.36	0.002
Invasión linfovascular					
No	104 (51.5)	1 (Referencia)			
Sí	98 (48.5)	2.21	1.28	3.78	0.004
Perforación intestinal					
No	161 (79.71)	1 (Referencia)			
Sí	41 (20.3)	1.47	0.85	2.88	0.16

Resultados

Figura 14: SLE en función de la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en la cohorte de diseño



2.4.2. Cohorte de validación

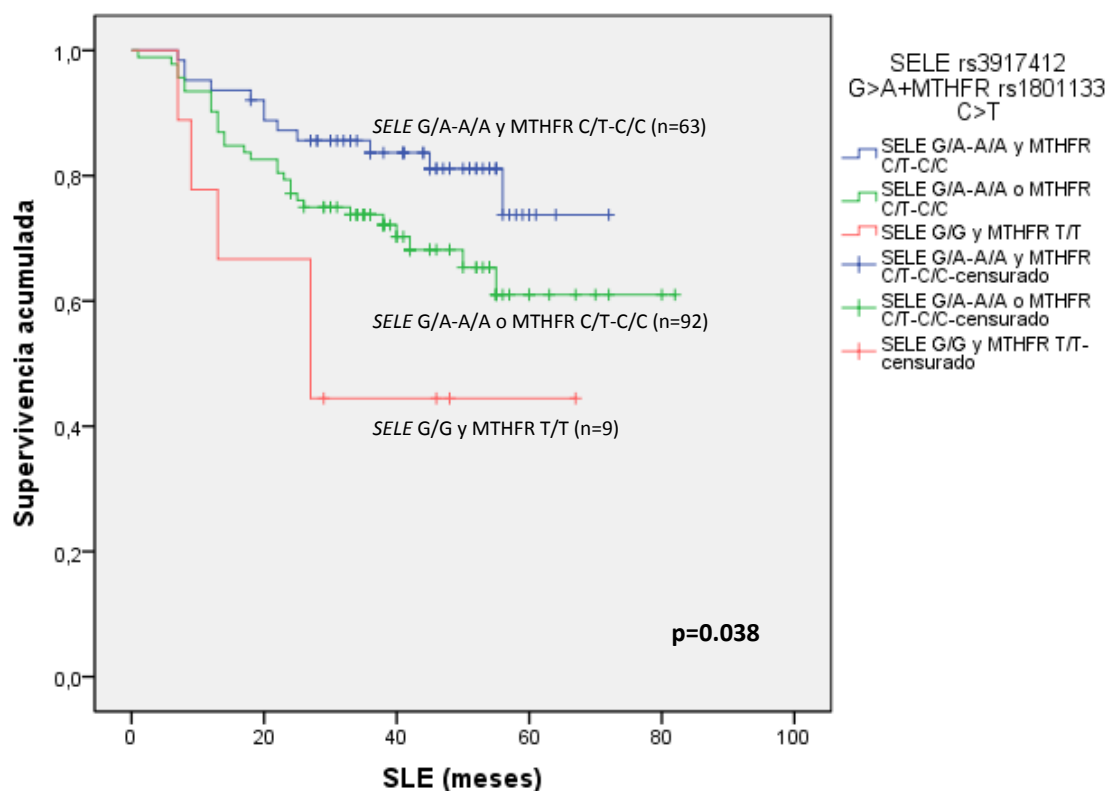
El valor pronóstico de la combinación de los SNPs SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T demostrado en la cohorte de diseño se validó de forma independiente en la segunda cohorte tanto en el análisis univariante como en el multivariante considerando el estadio, la perforación linfovascular y perineural y la perforación intestinal como covariantes (Tabla 40). Un total de 63 (35.6%) pacientes presentaron los genotipos SELE G/A-A/A y MTHFR C/T-C/C, 92 (52%) los genotipos SELE G/A-A/A o MTHFR C/T-C/C y 9 (5.1%) los genotipos SELE G/G y MTHFR T/T. La SLE a los 3 años en los portadores de los genotipos SELE G/G y MTHFR T/T fue significativamente inferior (44.4%; IC 95%, 27.8%-61%) que en aquellos con los genotipos SELE G/A-A/A o MTHFR C/T-C/C (73.8%; IC 95%, 69.2%-78.4%) y SELE G/A-A/A y MTHFR C/T-C/C (83.7%; IC 95%, 79%-88.4%) (Figura 15).

Tabla 40: Análisis uni y multivariante de la asociación entre la SLE y la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en la cohorte de validación

VARIABLE	N (%)	HR	IC 95%		p
			Superior	Inferior	
UNIVARIABLE					
SELE rs3917412 G>A + MTHFR rs1801133 C>T					0.031
SELE G/A-A/A y MTHFR C/T-C/C	63 (35.6)	1 (Referencia)			
SELE G/A-A/A o MTHFR C/T-C/C	92 (51)	1.86	0.98	3.64	0.052
SELE G/G y MTHFR T/T	9 (5.1)	3.85	1.36	10.96	0.011
MULTIVARIABLE					
SELE rs3917412 G>A + MTHFR rs1801133 C>T					0.038
SELE G/A-A/A y MTHFR C/T-C/C	63 (35.6)	1 (Referencia)			
SELE G/A-A/A o MTHFR C/T-C/C	92 (51)	2.37	1.18	4.75	0.015
SELE G/G y MTHFR T/T	9 (5.1)	2.45	4.12	7.33	0.028
Estadio					
II	45 (25.4)	1 (Referencia)			
III	132 (74.6)	2.04	0.92	5.07	0.08
Invasión linfovascular					
No	101 (57.1)	1 (Referencia)			
Sí	76 (42.9)	3.96	1.92	8.15	0.001
Invasión perineural					
No	131 (74)	1 (Referencia)			
Sí	46 (26)	6.7	2.86	15.73	0.001
Perforación intestinal					
No	157 (88.7)	1 (Referencia)			
Sí	20 (11.3)	3.01	1.33	6.76	0.008

Resultados

Figura 15: SLE en función de la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en la cohorte de validación



2.5. ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL EN FUNCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO ÚNICO

Al igual que en el análisis de la SLE, se llevó a cabo una evaluación inicial de la posible asociación entre los SNP y la SG mediante un modelo de Cox univariante. Posteriormente, se empleó un modelo de regresión múltiple para evaluar la posible implicación pronóstica independiente de los SNP relevantes respecto a la SG, utilizando los resultados clínico-patológicos significativos como covariables.

2.5.1. Cohorte de diseño

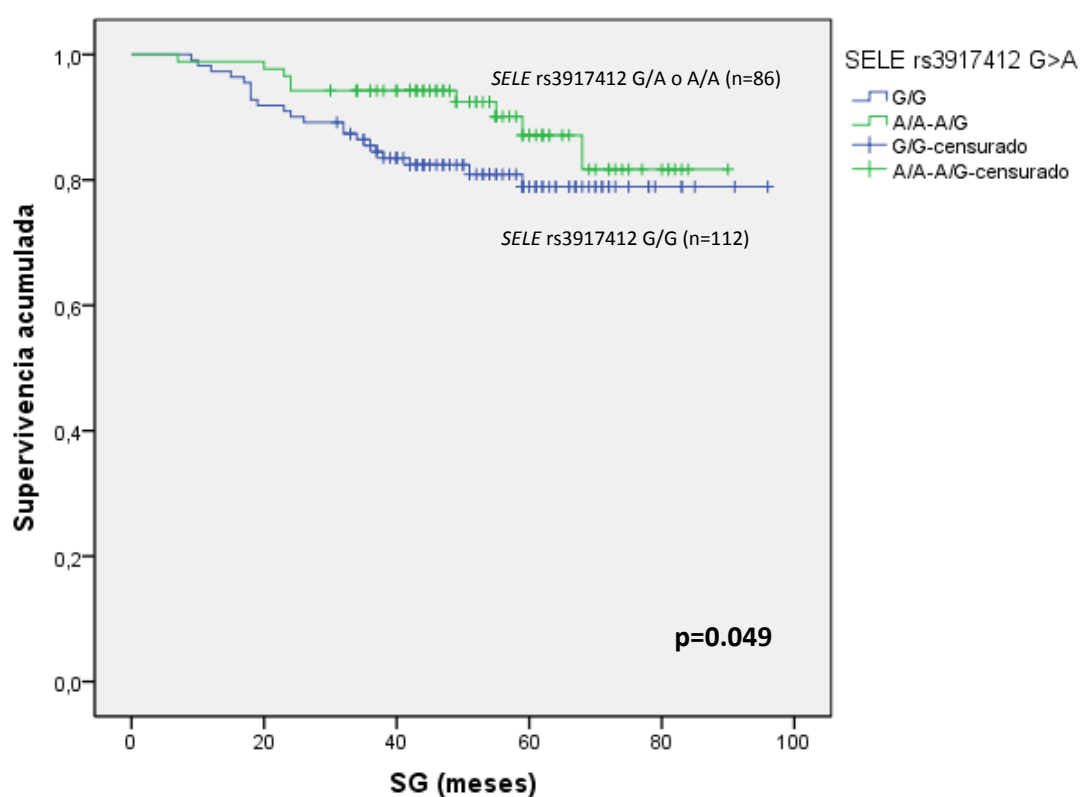
Se evidenció una asociación estadísticamente significativa entre el SNP SELE rs3917412 G>A y la SG en el análisis univariante, así como en el análisis multivariante

utilizando el estadio, la invasión linfovascular y la perforación intestinal como covariables. Respecto al SNP MTHFR rs1801133 C>T, se objetivó una tendencia hacia una SG superior en los portadores homocigotos del alelo T (T/T), pero las diferencias no alcanzaron la significación estadística.

A) SELE rs3917412 G>A

La SG a los 3 años fue del 85.5% (IC 95%, 82.1%-88.9%) en los pacientes con el genotipo SELE rs3917412 G/G, significativamente inferior a la de los portadores heterocigotos u homocigotos del alelo mutado A (G/A o A/A) (94.3%; IC 95%, 91.8%-96.8%) (HR=0.67; IC 95%, 0.21-0.95; p=0.049). La Figura 16 muestra las curvas de SG en función de los genotipos de dicho SNP.

Figura 16: SG en función del SNP SELE rs3917412 G>A en la cohorte de diseño

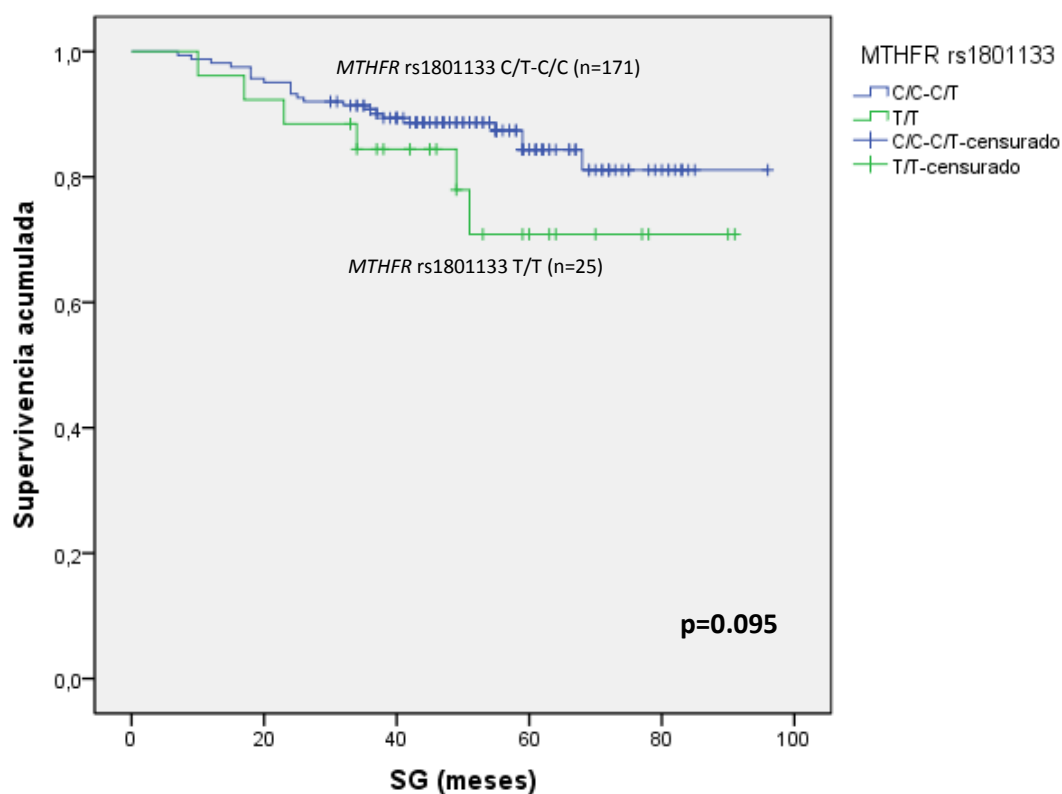


Resultados

B) MTHFR rs1801133 C>T

Con respecto al SNP MTHFR rs1801133 C>T, los portadores del genotipo homocigoto T/T presentaron una SG inferior (SG 3 años, 84.4%; IC 95%, 77.2%-91.6%) que aquellos heterocigotos u homocigotos para el alelo C (C/T o C/C) (SG 3 años, 90.8%; IC 95%, 88.5%-93.1%), pero las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas ($p=0.095$). Las curvas de SG en función de los genotipos de dicho SNP se representan en la Figura 17.

Figura 17: SG en función del SNP MTHFR rs1801133 C>T en la cohorte de diseño



C) Combinación SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T

Al igual que ocurre con la SLE, el análisis de la posible interacción entre la SG y la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T también demostró que los pacientes con los genotipos SELE G/G y MTHFR T/T presentaron un

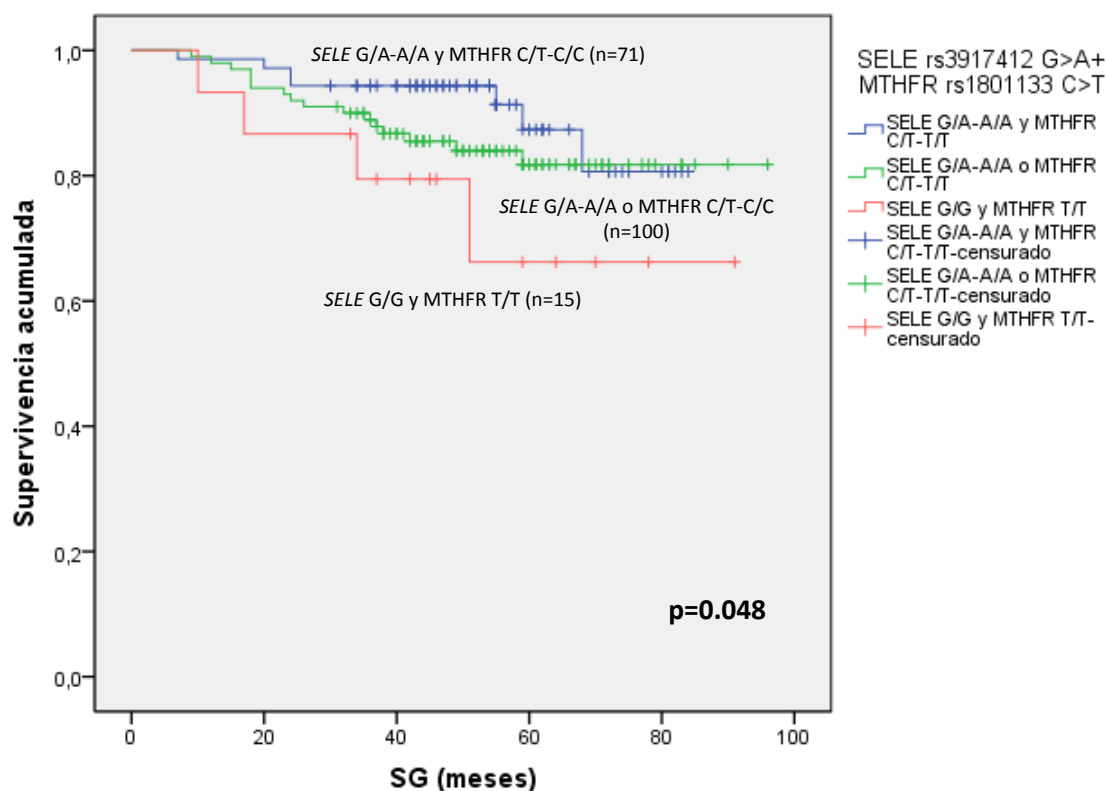
riesgo de fallecimiento significativamente superior que aquellos portadores de los genotipos SELE G/A-A/A y/o MTHFR C/T-C/C tanto en el análisis univariante como en el multivariante considerando el estadio, la invasión linfovascular y la perforación intestinal como covariantes ($p=0.048$) (Tabla 41). Así, la SG a los 3 años fue 79.4% (IC 95%, 68.8%-90%) para los portadores de los genotipos SELE G/G y MTHFR T/T, 88.9% (IC 95%, 85.8%-92%) para los portadores de los genotipos SELE G/A-A/A o MTHFR C/T-C/C y 94.4% (IC 95%, 91.7%-97.1%) para aquellos con los genotipos SELE G/A-A/A o MTHFR C/T-C/C (Figura 18).

Tabla 41: Análisis uni y multivariante de la asociación entre la SG y la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en la cohorte de diseño

VARIABLE	N (%)	HR	IC 95%		P
			Superior	Inferior	
UNIVARIABLE					
SELE rs3917412 G>A + MTHFR rs1801133 C>T					0.041
SELE G/A-A/A y MTHFR C/T-C/C	71 (35.2)	1 (Referencia)			
SELE G/A-A/A o MTHFR C/T-C/C	100 (49.5)	1.66	0.91	4.04	0.098
SELE G/G y MTHFR T/T	15 (7.4)	3.01	1.18	8.29	0.039
MULTIVARIABLE					
SELE rs3917412 G>A + MTHFR rs1801133 C>T					0.048
SELE G/A-A/A y MTHFR C/T-C/C	71 (35.2)	1 (Referencia)			
SELE G/A-A/A o MTHFR C/T-C/C	100 (49.5)	1.86	0.91	4.57	0.091
SELE G/G y MTHFR T/T	15 (7.4)	3.39	1.03	9.29	0.044
Estadio					
II	60 (29.7)	1 (Referencia)			
III	142 (70.3)	3.62	1.03	9.65	0.044
Invasión linfovascular					
No	104 (51.5)	1 (Referencia)			
Sí	98 (48.5)	3.16	1.37	1.86	0.007
Perforación intestinal					
No	161 (79.7)	1 (Referencia)			
Sí	41 (20.3)	1.27	0.75	3.36	0.851

Resultados

Figura 18: SG en función de la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en la cohorte de diseño



2.5.2. Cohorte de validación

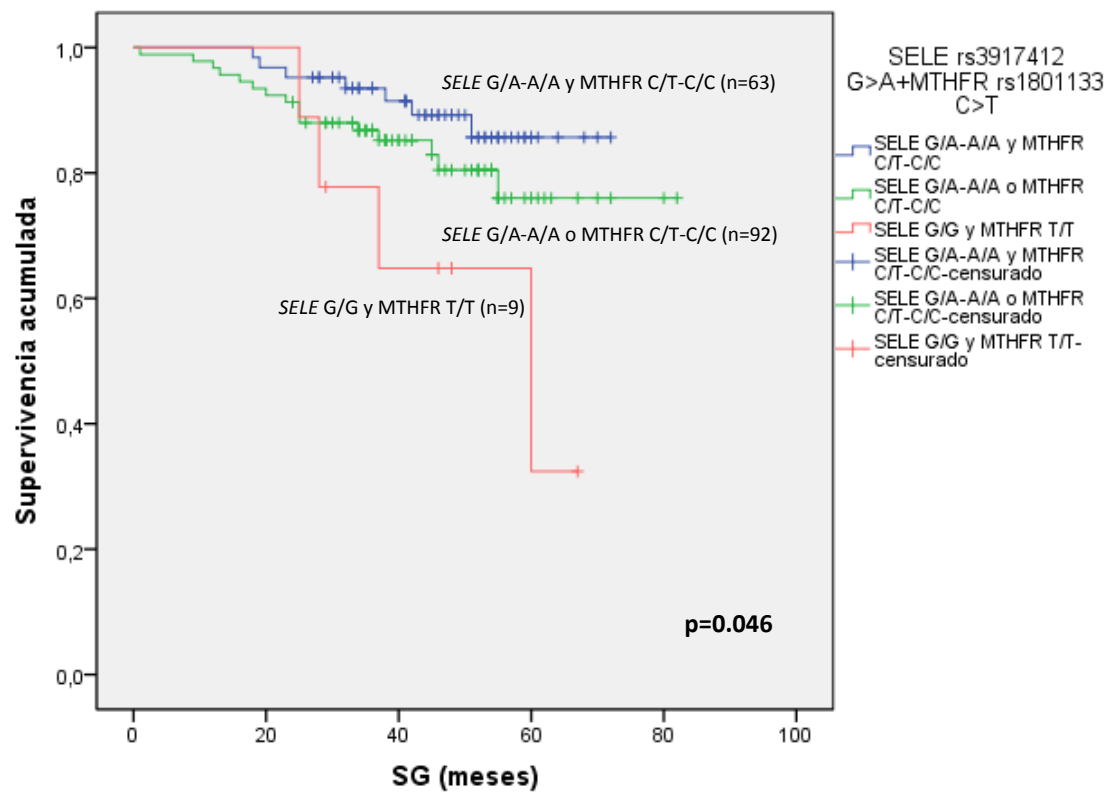
Al igual que ocurre con la SLE, el valor pronóstico de la combinación de los SNPs SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T demostrado en la cohorte de diseño en relación con la SG se ha podido validar de forma independiente en la segunda cohorte tanto en el análisis univariante como en el multivariante considerando como covariantes el estadio, la perforación linfovascular y perineural y la perforación intestinal (Tabla 42). La SG a los 3 años en los portadores de los genotipos SELE G/G y MTHFR T/T fue de 77.8% (IC 95%, 63.9%-91.7%), significativamente inferior que en aquellos con los genotipos SELE G/A-A/A o MTHFR C/T-C/C (86.8%; IC 95%, 83.2%-90.4%) y SELE G/A-A/A y MTHFR C/T-C/C (93.5%; IC 95%, 90.4%-96.6%) (Figura 19).

Tabla 42: Análisis uni y multivariante de la asociación entre la SG y la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en la cohorte de validación

VARIABLE	N (%)	HR	IC 95%		P
			Superior	Inferior	
UNIVARIABLE					
SELE rs3917412 G>A + MTHFR rs1801133 C>T					0.039
SELE G/A-A/A y MTHFR C/T-C/C	63 (35.6)	1 (Referencia)			
SELE G/A-A/A o MTHFR C/T-C/C	92 (51)	1.86	0.92	4.28	0.053
SELE G/G y MTHFR T/T	9 (5.1)	4.11	1.2	11.01	0.024
MULTIVARIABLE					
SELE rs3917412 G>A + MTHFR rs1801133 C>T					0.046
SELE G/A-A/A y MTHFR C/T-C/C	63 (35.6)	1 (Referencia)			
SELE G/A-A/A o MTHFR C/T-C/C	92 (51)	2.46	0.99	5.01	0.052
SELE G/G y MTHFR T/T	9 (5.1)	3.41	1.99	9.26	0.038
Estadio					
II	45 (25.4)	1 (Referencia)			
III	132 (74.6)	1.46	0.57	3.59	0.453
Invasión linfovascular					
No	101(57.1)	1 (Referencia)			
Sí	76 (42.9)	5.27	1.93	9.39	0.001
Invasión perineural					
No	131 (74)	1 (Referencia)			
Sí	46 (26)	8.51	2.77	16.18	0.001
Perforación intestinal					
No	157 (88.7)	1 (Referencia)			
Sí	20 (11.3)	1.93	0.88	4.51	0.17

Resultados

Figura 19: SG en función de la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en la cohorte de validación



2.6. VALOR PRONÓSTICO DE LOS SNP SELE rs3917412 G>A Y MTHFR rs1801133 C>T EN FUNCIÓN DEL ESTADIO Y DEL SEXO

Finalmente, se ha evaluado el valor pronóstico de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en función del sexo y del estadio de la enfermedad. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución alélica de ambos polimorfismos entre pacientes con estadio II vs. estadio III (Tabla 43) o entre hombres vs. mujeres (Tabla 44)

Tabla 43: Distribución alélica de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en función del estadio en la cohorte de diseño y de validación

Distribución alélica	COHORTE DISEÑO (N, %)		COHORTE VALIDACIÓN (N, %)	
	Estadio II	Estadio III	Estadio II	Estadio III
SELE rs3917412 G>A				
G/G	33 (55.9)	79 (56.8)	24 (53.3)	70 (54.7)
G/A	22 (37.3)	53 (38.1)	17 (37.8)	52 (40.6)
A/A	4 (6.8)	7 (5.1)	4 (8.9)	6 (4.7)
TOTAL	59 (29.8)	139 (70.2)	45 (26)	128 (74)
MTHFR rs1801133 C>T				
C/C	25 (42.4)	62 (45.3)	20 (44.4)	58 (45.3)
C/T	26 (44)	58 (42.3)	19 (42.2)	56 (43.8)
T/T	8 (13.6)	17 (12.4)	6 (13.3)	14 (10.9)
TOTAL	59 (30.1)	137 (69.9)	45 (26)	128 (74)
SELE rs3917412 G>A + MTHFR rs1801133 C>T				
SELE G/A-A/A y MTHFR C/T-C/C	19 (37.2)	52 (38.5)	16 (39)	47 (38.2)
SELE G/A-A/A o MTHFR C/T-C/C	29 (56.9)	71 (52.6)	23 (56.1)	69 (56.1)
SELE G/G y MTHFR T/T	3 (5.9)	12 (8.9)	2 (4.9)	7 (5.7)
TOTAL	51 (27.4)	135 (72.6)	41 (25)	123 (75)

Resultados

Tabla 44: Distribución alélica de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en función del sexo en la cohorte de diseño y de validación

Distribución alélica	COHORTE DISEÑO (N, %)		COHORTE VALIDACIÓN (N, %)	
	Varón	Mujer	Varón	Mujer
SELE rs3917412 G>A				
G/G	64 (56.2)	47 (56.6)	42 (54.5)	52 (54.2)
G/A	43 (37.7)	32 (38.6)	30 (39)	39 (40.6)
A/A	7 (6.1)	4 (4.8)	5 (6.5)	5 (5.2)
TOTAL	114 (57.9)	83 (42.1)	77 (44.5)	96 (55.5)
MTHFR rs1801133 C>T				
C/C	50 (45.1)	37 (43.5)	35 (45.4)	43 (44.8)
C/T	47 (42.3)	37 (43.5)	33 (42.9)	42 (43.7)
T/T	14 (12.6)	11 (13)	9 (11.7)	11 (11.5)
TOTAL	111 (56.6)	85 (43.4)	77 (44.5)	96 (55.5)
SELE rs3917412 G>A + MTHFR rs1801133 C>T				
SELE G/A-A/A y MTHFR C/T-C/C	43 (39.1)	32 (40)	29 (38.7)	34 (38.2)
SELE G/A-A/A o MTHFR C/T-C/C	60 (54.6)	40 (50)	42 (56)	50 (56.2)
SELE G/G y MTHFR T/T	7 (6.3)	8 (10)	4 (5.3)	5 (5.6)
TOTAL	110 (57.9)	80 (42.1)	75 (45.7)	89 (54.3)

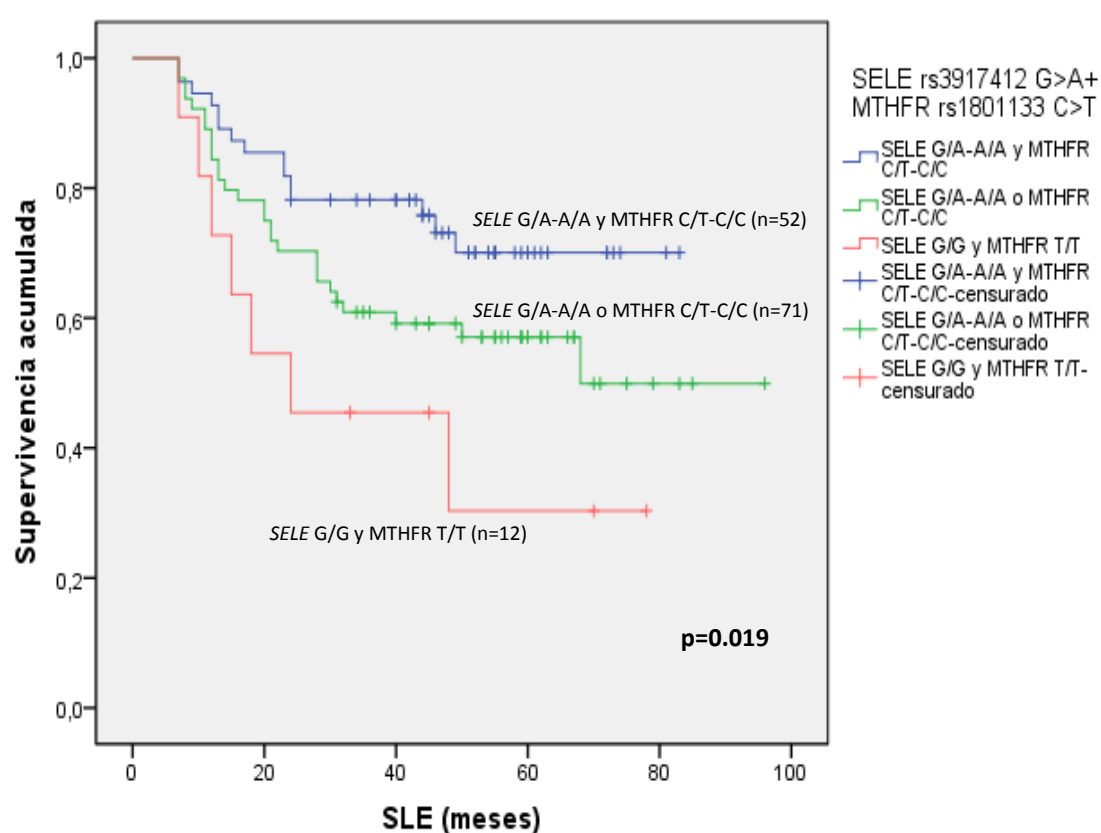
2.6.1. Valor pronóstico de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en función del estadio

2.6.1.1. Supervivencia libre de enfermedad

En la cohorte de diseño se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la combinación de los genotipos SELE rs3917412 G/G y MTHFR rs1801133 T/T y la SLE en los pacientes con estadio III, tanto en el análisis univariante como en la regresión logística considerando la infiltración linfovascular, la infiltración perineural y la perforación intestinal como covariantes. Los pacientes con los genotipos SELE G/G y MTHFR T/T presentaron una SLE a los 3 años del 45.5% (IC 95%, 30.5%-60%), significativamente inferior a la de aquellos con la combinación SELE G/A-A/A o

MTHFR C/C-C/T (78.2%; IC 95%, 72.6%-83.8%) o a la de los portadores de los genotipos SELE G/A-A/A y MTHFR C/C-C/T (60.9%; IC 95%, 54.8%-70%) (HR=2.657; 95% CI, 1.3-5.42; p=0.027) (Figura 20).

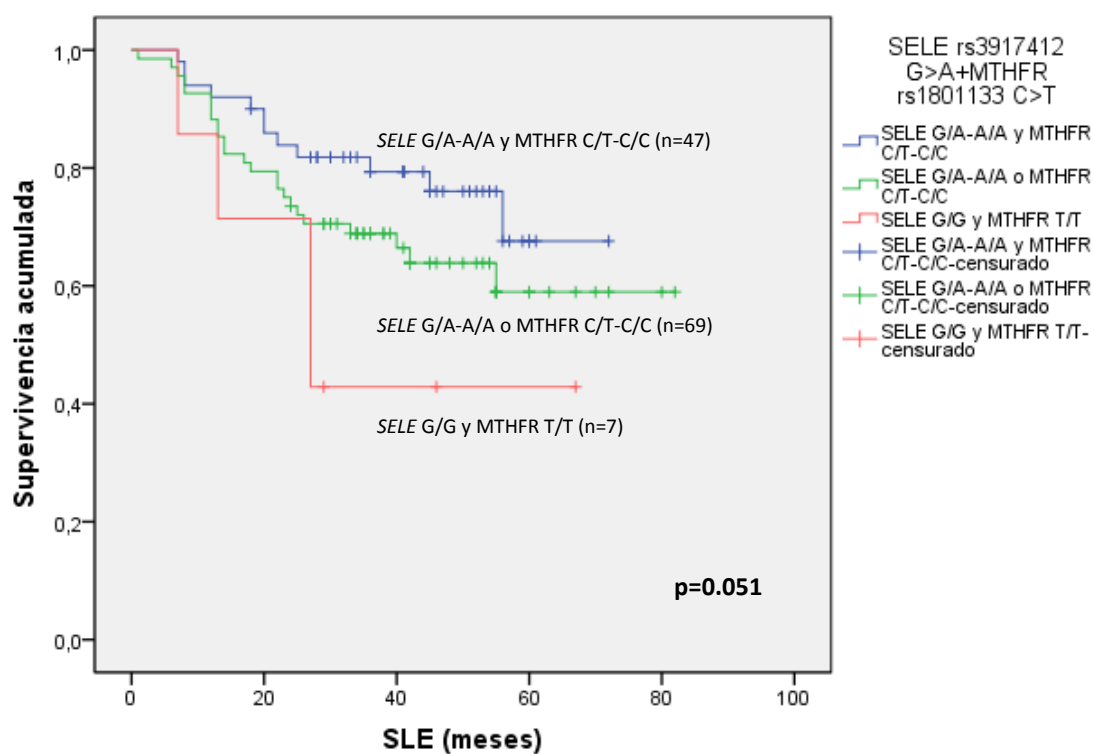
Figura 20: SLE en función de la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en pacientes con estadio III (cohorte de diseño)



En la cohorte de validación, los pacientes con los genotipos SELE G/G y MTHFR T/T también presentaron un riesgo de recidiva superior (SLE 3 años, 42.9%; IC 95%, 24.2%-61.6%) que los portadores de los genotipos SELE G/A-A/A o MTHFR C/C-C/T (SLE 3 años, 79.3%; IC 95%, 73.4%-84.1%) o que aquellos con la combinación SELE G/A-A/A y MTHFR C/C-C/T (SLE 3 años, 68.9%; IC 95%, 63.3%-74.5%), encontrándose las diferencias en el límite de la significación estadística (HR=2.59; IC 95%, 1.02-6.57; p=0.051) (Figura 21).

Resultados

Figura 21: SLE en función de la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en pacientes con estadio III (cohorte de validación)



La Tabla 45 resume los datos del análisis uni y multivariante de la asociación entre la SLE y la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en los pacientes con estadio III tanto en la cohorte de diseño como en la de validación.

Tabla 45: Análisis de la asociación entre la SLE y la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en los pacientes con estadio III

	C.DISEÑO			C.VALIDACIÓN		
VARIABLE	N (%)	HR (IC 95%)	p	N (%)	HR (IC 95%)	p
UNIVARIABLE						
SELE rs3917412 G>A + MTHFR rs1801133 C>T						0.061
SELE G/A-A/A y MTHFR C/T-C/C	52 (38.5)	1 (Referencia)	0.039	47 (38.2)	1 (Referencia)	
SELE G/A-A/A o MTHFR C/T-C/C	71 (52.6)	1.74 (0.93-3.26)	0.084	69 (56.1)	1.92 (0.97-3.25)	0.098
SELE G/G y MTHFR T/T	12 (8.9)	3.08 (1.25-7.58)	0.014	7 (5.7)	2.91 (1.06-9.01)	0.048
MULTIVARIABLE						
SELE rs3917412 G>A + MTHFR rs1801133 C>T						0.051
SELE G/A-A/A y MTHFR C/T-C/C	52 (38.5)	1 (Referencia)	0.019	47 (38.2)	1 (Referencia)	
SELE G/A-A/A o MTHFR C/T-C/C	71 (52.6)	2.02 (1.06-3.82)	0.033	69 (56.1)	1.76 (0.98-3.87)	0.062
SELE G/G y MTHFR T/T	12 (8.9)	3.71 (1.39-9.92)	0.009	7 (5.7)	2.59 (1.02-6.56)	0.045
Invasión linfovascular						
No	80 (59.3)	1 (Referencia)		73 (59.4)	1 (Referencia)	
Sí	55 (40.7)	1.85 (0.98-3.78)	0.059	50 (40.6)	5.65 (2.38-8.62)	0.001
Invasión perineural						
No	83 (61.5)	1 (Referencia)		90 (8.6)	1 (Referencia)	
Sí	52 (38.5)	2.06 (0.86-4.91)	0.103	33 (11.4)	5.65 (2.38-9.36)	0.001
Perforación intestinal						
No	108 (80)	1 (Referencia)		109 (8.6)	1 (Referencia)	
Sí	27 (20)	1.22 (0.76-1.98)	0.208	14 (11.4)	2.82 (1.23-8.62)	0.001

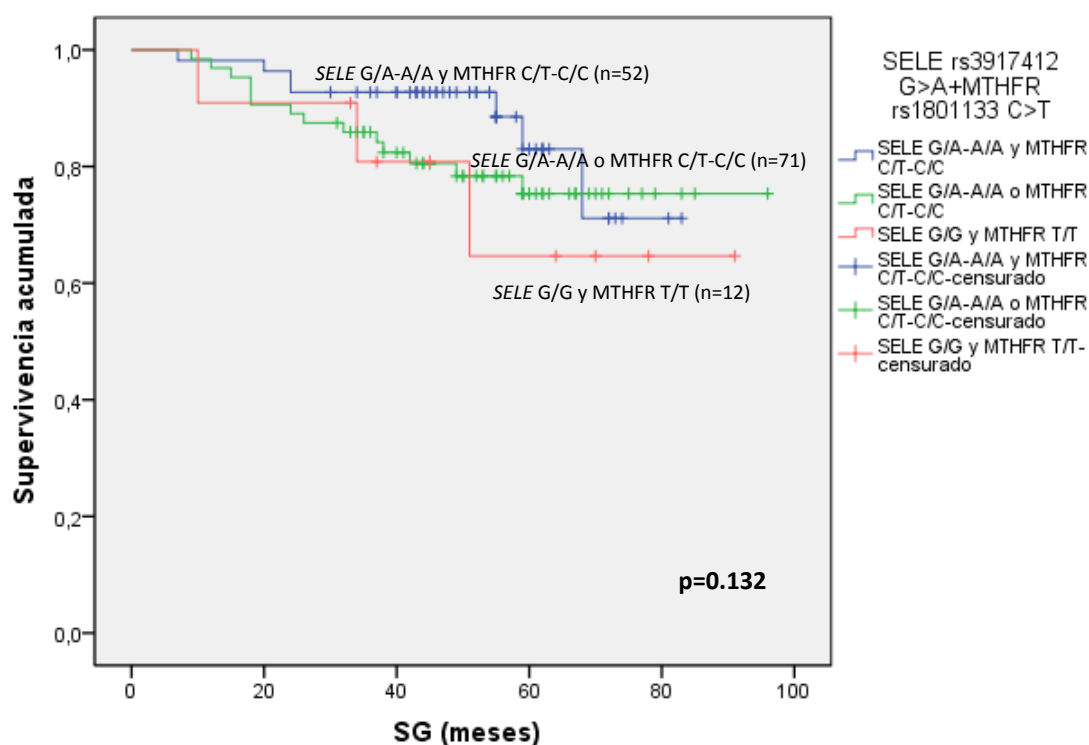
En el caso de los estadio II, los pacientes con la combinación de los genotipos SELE G/G y MTHFR T/T presentaron un mayor riesgo de recaída que aquellos con los genotipos SELE G/A-A/A y/o MTHFR C/T-C/C tanto en la cohorte de diseño (HR=3.93, 95% CI, 0.91-16.48, p=0.071) como en la cohorte de validación (HR=4.17, 95% CI, 0.88-21.08, p=0.106), pero las diferencias no alcanzaron la significación estadística.

Resultados

2.6.1.2. Supervivencia global

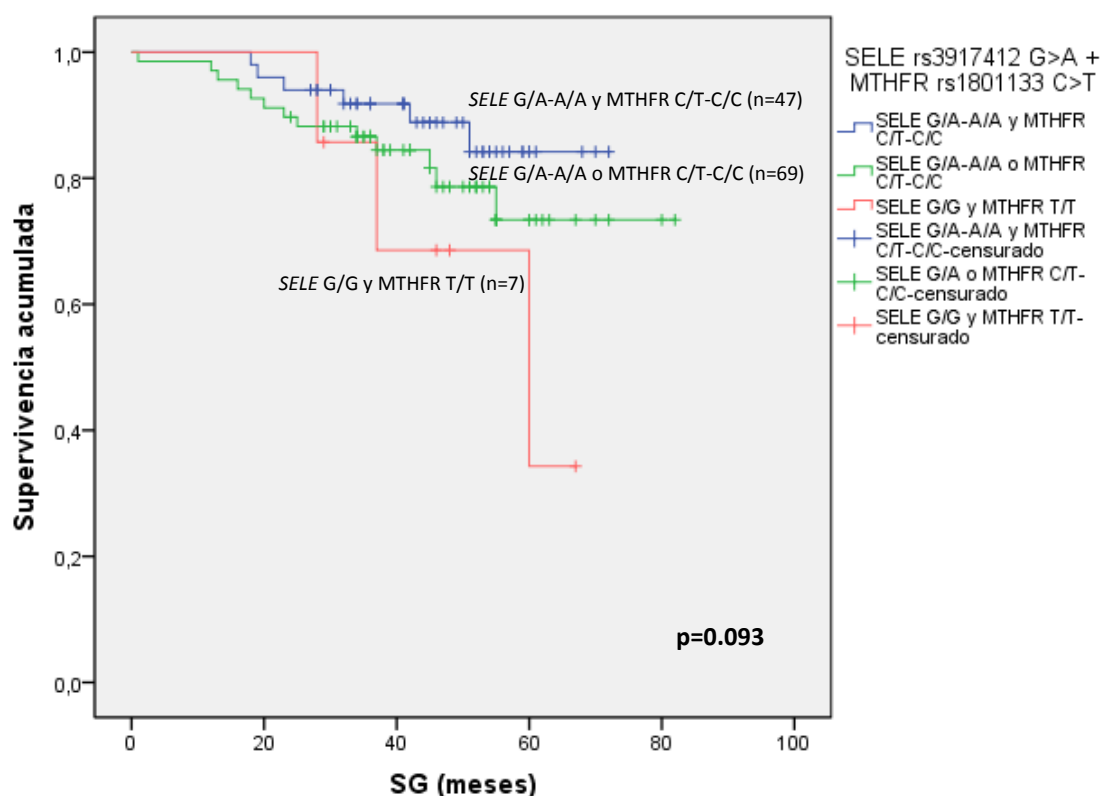
En los pacientes con estadio III pertenecientes a la cohorte de diseño, la SG a los 3 años fue 80.8% (IC 95%, 68.6%-93%) para portadores de los genotipos SELE G/G y MTHFR T/T, 85.9% (IC 95%, 81.5%-90.3%) en los pacientes con los genotipos SELE G/G o MTHFR T/T y 92.7% (IC 95%, 89.2%-96.2%) en aquellos con la combinación SELE G/A-A/A y MTHFR C/T-C/C, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas en la regresión logística considerando la performance intestinal y la infiltración linfovascular y perineural como covariantes (HR=2.19; IC 95%, 0.92-8.51; $p=0.132$) (Figura 22).

Figura 22: SG en función de la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en pacientes con estadio III (cohorte de diseño)



De forma similar, en la cohorte de validación, el riesgo de fallecimiento también fue superior en los pacientes con el genotipo SELE G/G y MTHFR T/T (SG 3 años, 68.6%; IC 95%, 50%-87.2%) que en aquellos con los genotipos SELE G/A-A/A o MTHFR C/T-C/C (86.8%; IC 95%, 83.2%-90.4%) y SELE G/A-A/A y MTHFR C/T-C/C (93.5%; IC 95%, 90.4%-96.6%), encontrándose las diferencias próximas a la significación estadística en el análisis multivariante (HR=3.414; IC 95%, 0.96-10.68; $p=0.093$) (Figura 23).

Figura 23: SG en función de la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en pacientes con estadio III (cohorte de validación)



En cuanto a los pacientes con estadio II, no se encontraron diferencias significativas en la SG en función de los genotipos SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T ni en la cohorte de diseño (HR=2.23; 95% CI, 0.71-21.46; $p=0.12$) ni en la de validación (HR=5.65; 95% CI, 0.82-23.1; $p=0.201$).

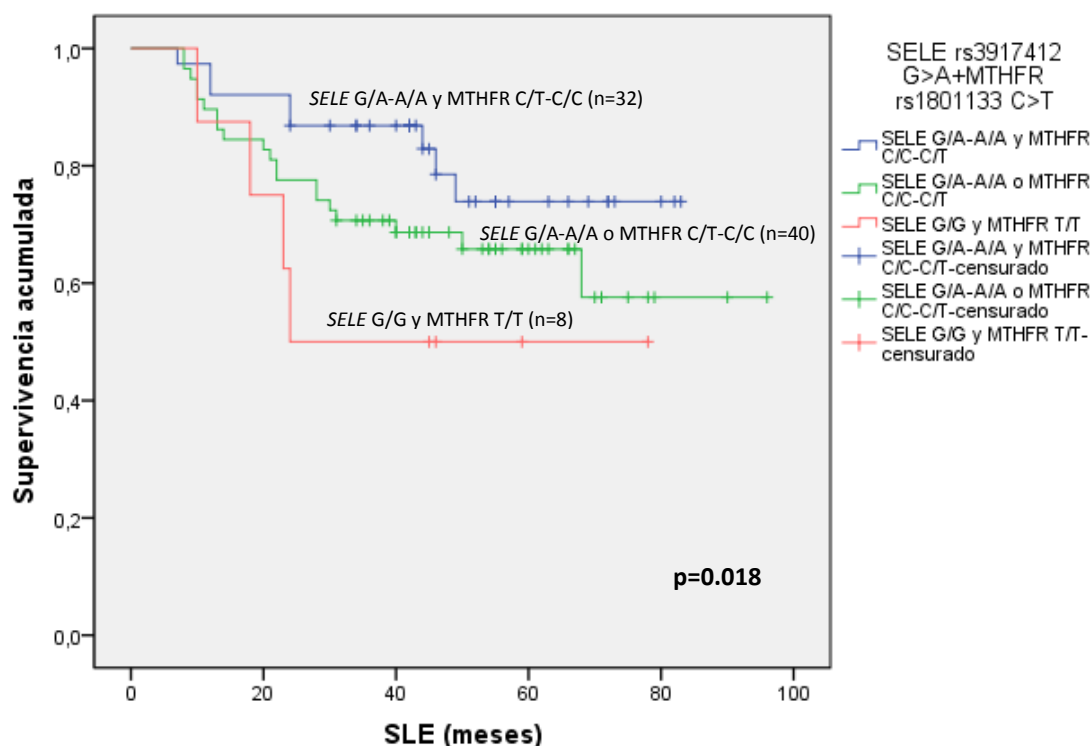
Resultados

2.6.2. Valor pronóstico de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en función del sexo

2.6.2.1. Supervivencia libre de enfermedad

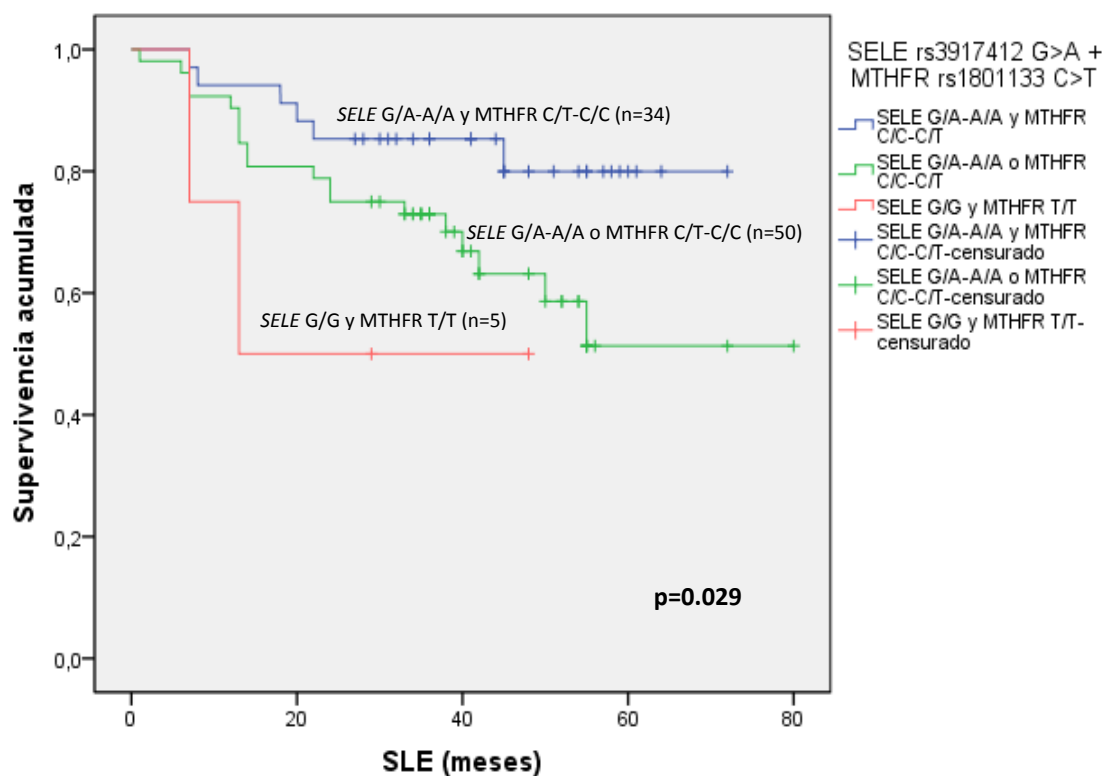
En el análisis estratificado en función del sexo, las mujeres de la cohorte de diseño portadoras de los genotipos SELE rs3917412 G/G y MTHFR rs1801133 T/T presentaron un riesgo de recaída significativamente superior (SLE 3 años, 50.8%; IC 95%, 33.1%-68.5%) que aquellas con los genotipos SELE G/A-A/A o MTHFR C/C-C/T (SLE 3 años, 70.7%; IC 95%, 64.7%-76.7%) o SELE G/A-A/A y MTHFR C/C-C/T (SLE 3 años, 86.8%; IC 95%, 81.3%-92.3%) tanto en el análisis univariante como en el multivariante considerando el estadio, la perforación linfovascular y perineural y la perforación intestinal como covariantes ($p=0.018$) (Figura 24 y Tabla 46).

Figura 24: SLE en función de la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en mujeres (cohorte de diseño)



En la cohorte de validación, las mujeres con los genotipos SELE rs3917412 G/G y MTHFR rs1801133 T/T presentaron una SLE a los 3 años de 50.2% (IC 95%, 38.2%-62.2%), significativamente inferior a la de las pacientes con la combinación SELE G/A-A/A o MTHFR C/C-C/T (73.1%; IC 95%, 66.9%-79.3%) y a la de las portadoras de los genotipos SELE G/A-A/A y MTHFR C/C-C/T (85.3%; IC 95%, 79.2%-91.4%) ($p=0.029$) (Figura 25 y Tabla 46).

Figura 25: SLE en función de la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en mujeres (cohorte de validación)



Resultados

Tabla 46: Análisis uni y multivariante de la asociación entre la SLE y la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en mujeres

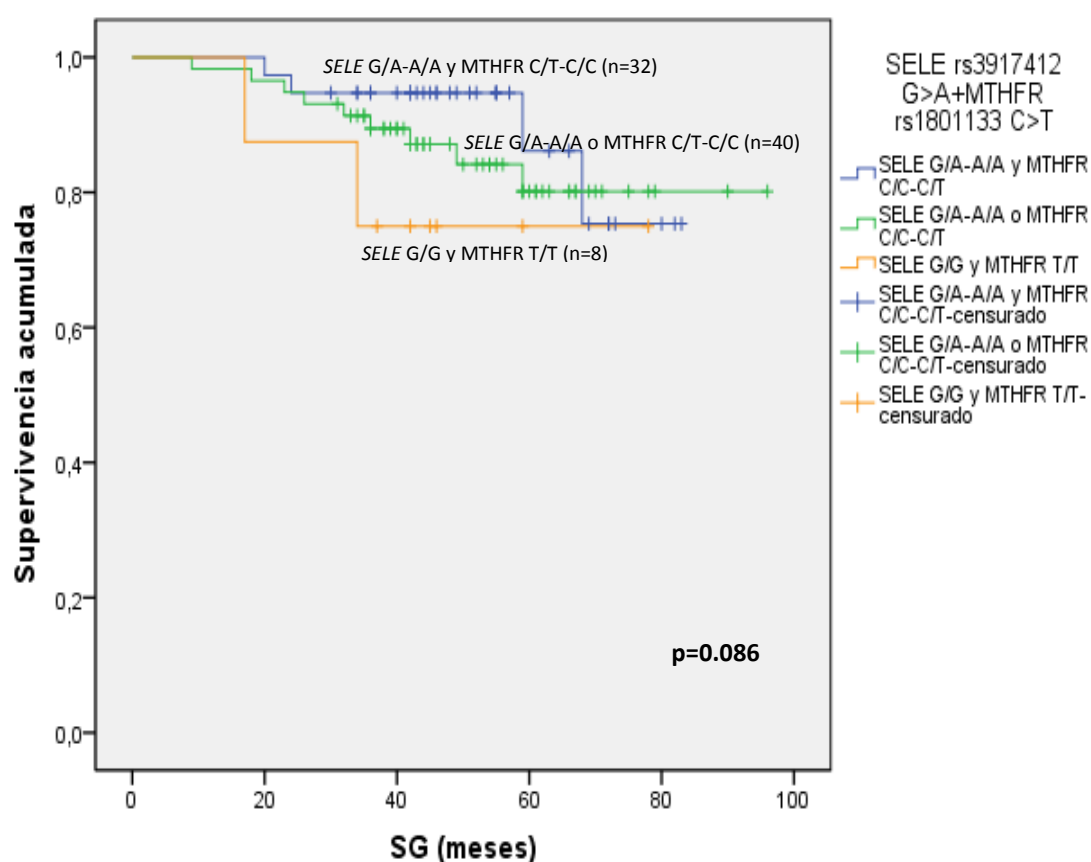
	C.DISEÑO			C.VALIDACIÓN		
VARIABLE	N (%)	HR (IC 95%)	p	N (%)	HR (IC 95%)	p
UNIVARIABLE						
SELE rs3917412 G>A + MTHFR rs1801133 C>T						0.036
SELE G/A-A/A y MTHFR C/T-C/C	32 (40)	1 (Referencia)	0.043	34 (38.2)	1 (Referencia)	
SELE G/A-A/A o MTHFR C/T-C/C	40 (50)	2.37 (0.94-5.95)	0.056	50 (56.2)	2.34 (1.07-2.55)	0.048
SELE G/G y MTHFR T/T	8 (10)	4.61 (1.92-7.56)	0.038	5 (5.6)	3.78 (1.26-8.33)	0.017
MULTIVARIABLE						
SELE rs3917412 G>A + MTHFR rs1801133 C>T						0.029
SELE G/A-A/A y MTHFR C/T-C/C	32 (40)	1 (Referencia)	0.018	34 (38.2)	1 (Referencia)	
SELE G/A-A/A o MTHFR C/T-C/C	40 (50)	2.82 (1.12-4.55)	0.038	50 (56.2)	2.96 (1.48-5.05)	0.042
SELE G/G y MTHFR T/T	8 (10)	5.26 (1.67-9.57)	0.005	5 (5.6)	6.67 (1.96-9.97)	0.005
Estadio						
II	19 (23.7)	1 (Referencia)		22 (24.7)	1 (Referencia)	
III	61 (76.3)	3.47 (0.98-8.37)	0.086	67 (75.3)	2.72 (0.98-7.51)	0.053
Invasión linfvascular						
No	44 (55)	1 (Referencia)		50 (56.2)	1 (Referencia)	
Sí	36 (45)	1.64 (0.83-6.26)	0.268	39 (43.8)	1.31 (0.88-3.61)	0.343
Invasión perineural						
No	54 (67.5)	1 (Referencia)		71 (79.8)	1 (Referencia)	
Sí	26 (32.5)	1.86 (0.78-5.09)	0.103	18 (20.2)	6.91 (2.37-9.98)	0.001
Perforación intestinal						
No	69 (86.3)	1 (Referencia)		80 (89.9)	1 (Referencia)	
Sí	11 (13.7)	1.32 (0.81-1.87)	0.215	9 (10.1)	2.57 (0.97-6.85)	0.058

En el caso los varones, no se objetivaron diferencias significativas en la SLE en función de los genotipos de la SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T ni en la cohorte de diseño (HR=1.92, 95% CI, 0.71-10.65, p=0.231) ni en la de validación (HR=2.01, 95% CI, 0.81-9.56, p=0.156).

2.6.2.2. Supervivencia global

En la cohorte de diseño, las mujeres portadoras de los genotipos SELE G/G y MTHFR T/T presentaron una SG a 3 años del 75.1% (IC 95%, 59.7%-90.3%), inferior a la de aquellos con los genotipos SELE G/A-A/A o MTHFR C/T-C/C (89.4%; IC 95%, 85.3%-93.5%) o SELE G/A-A/A y MTHFR C/T-C/C (94.7%; IC 95%, 98.3-91.1%), encontrándose las diferencias en el límite de la significación estadística en la regresión logística considerando el estadio, la permeación linfocascular y perineural y la perforación intestinal como covariantes (HR=3.4; IC 95%, 0.922-10.045; $p=0.086$) (Figura 26).

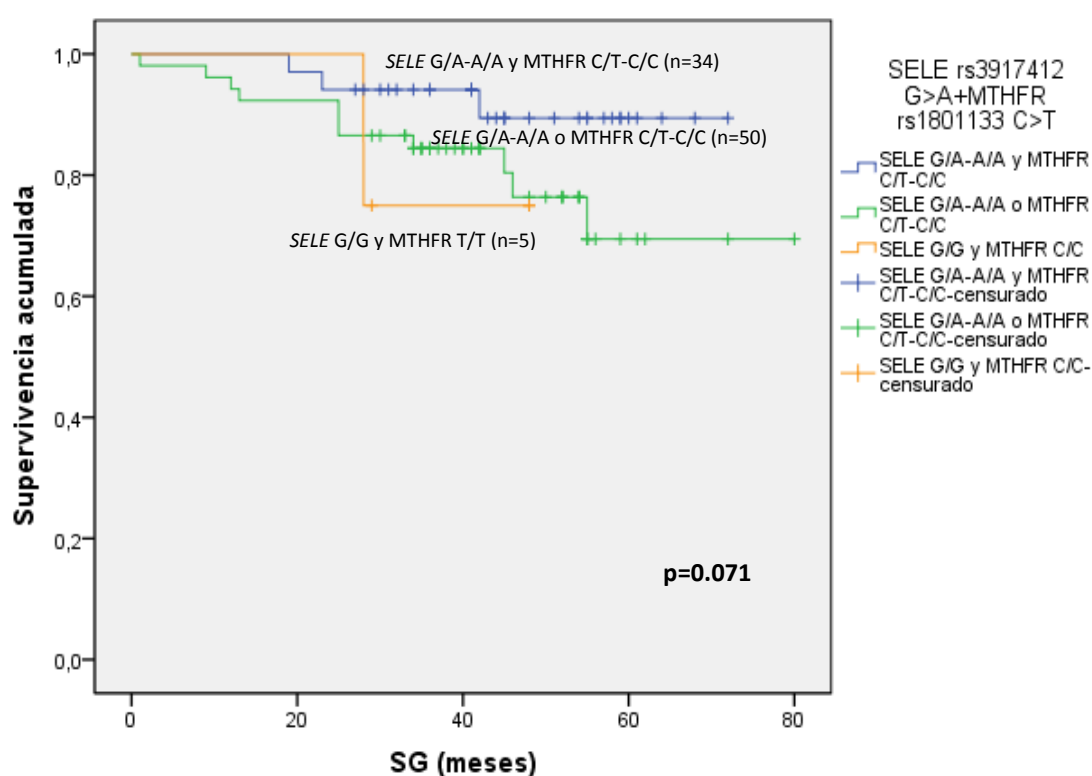
Figura 26: SG en función de la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en mujeres (cohorte de diseño)



Resultados

En la cohorte de validación también se objetivó una tendencia no estadísticamente significativa a un pronóstico desfavorable en las mujeres portadoras de los genotipos SELE G/G y MTHFR T/T (SG 3 años, 75.2%; IC 95%, 53.5%-96.9%) que en aquellas con los genotipos SELE G/A-A/A o MTHFR C/T-C/C (84.4%; IC 95%, 79.3%-89.5%) y SELE G/A-A/A y MTHFR C/T-C/C (94.1%; IC 95%, 90.1%-98.1%) (HR=7.83; IC 95%, 0.94-14.62; p=0.071) (Figura 27).

Figura 27: SG en función de la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en mujeres (cohorte de validación)



Con respecto a los pacientes varones, no se encontraron diferencias significativas en la SG en función de los genotipos SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T ni en la cohorte de diseño (HR=2.54; 95% CI, 0.75%-14.93%; p=0.174) ni en la de validación (HR=1.94, 95% CI, 0.67%-5.29%, p=0.215).

3. ANÁLISIS DE TOXICIDAD

3.1. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD GLOBAL Y DE LAS TOXICIDADES ESPECÍFICAS

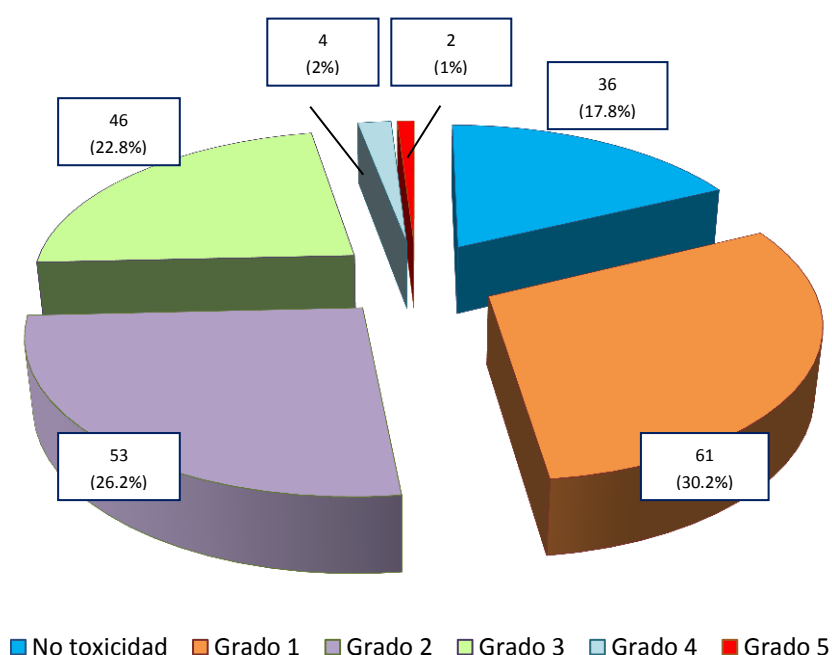
3.1.1. Toxicidad global

En la cohorte de diseño 114 (56.4%) pacientes experimentaron al menos un efecto secundario grado 1-2 y 52 (25.7%) al menos un efecto secundario grado ≥ 3 (22.8% grado 3, 2% grado 4 y 1% grado 5). Con respecto a la cohorte de validación, se objetivaron eventos adversos grado 1-2 en 95 (53.7%) pacientes, mientras que 43 (24.3%) experimentaron al menos un evento adverso grado ≥ 3 (20.9% grado 3, 2.8% grado 4 y 0.6% grado 5) (Figura 28). No se encontraron diferencias significativas entre las dos cohortes en cuanto a la incidencia de toxicidad grado 1-2 ($p=0.34$) ni toxicidad grado ≥ 3 ($p=0.23$).

Se estudió la posible asociación entre la incidencia de toxicidad severa y las características basales de los pacientes, el tratamiento adyuvante o el pronóstico de la enfermedad, sin encontrarse diferencias significativas en ninguna de las dos cohortes.

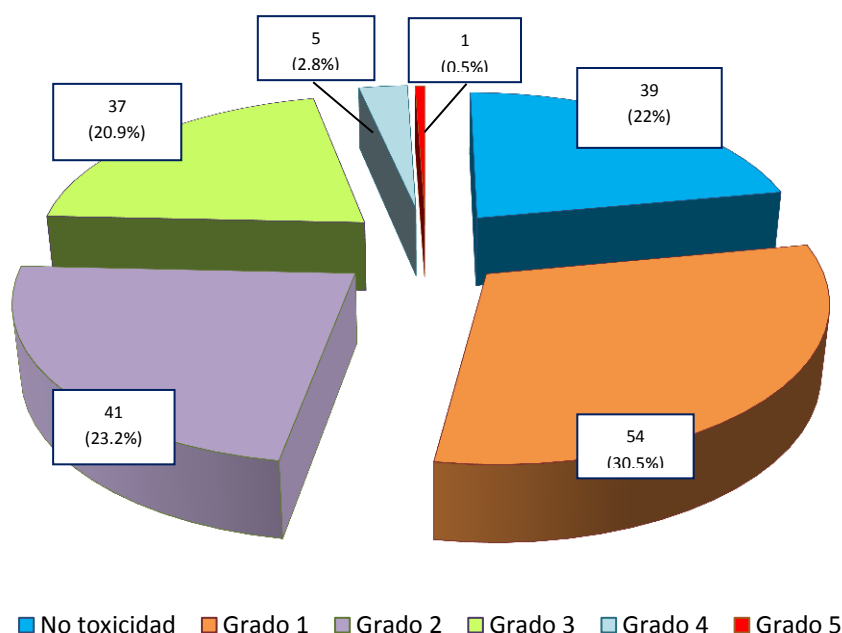
Figura 28: Toxicidad global en la cohorte de diseño y de validación

Cohorte de diseño



Resultados

Cohorte de validación



En la cohorte de diseño, entre los 114 pacientes que experimentaron toxicidad grado 1-2 fue necesario suspender el tratamiento en 3 (2.6%) casos, reducir la dosis en 12 (10.5%), aplazar el tratamiento en 15 (13.2%) y reducir la dosis y aplazar el tratamiento en 13 (11.4%). Sin embargo, la mayoría de los 52 casos con toxicidad grado 3-5 presentaron consecuencias terapéuticas: se suspendió el tratamiento en 29 (55.8%) pacientes, 40 (76.9%) precisaron reducción de dosis, 48 (92.3%) retrasos del tratamiento y 42 (80.8%) reducción la dosis y aplazamientos. Cinco (9.6%) pacientes fueron hospitalizados por toxicidad: 2 casos de neutropenia febril, 1 caso de neumonía y neutropenia grado 3 y 2 casos de toxicidad digestiva grado 3-4.

En la cohorte de validación, en la mayoría de los 95 pacientes con eventos adversos grado 1-2 no se modificó la actitud terapéutica. Fue necesario suspender el tratamiento en 3 (3.2%) pacientes, reducir la dosis en 10 (10.5%), retrasar el tratamiento en 16 (30.8%) y aplazar el tratamiento y reducir la dosis en 12 (12.6%) pacientes. En cambio, 39 (90.7%) de los 43 pacientes con toxicidad grado 3-4 precisaron interrumpir precozmente el tratamiento, 36 (83.7%) requirieron reducir la dosis, 41 (95.3%) aplazar el tratamiento y 38 (88.4%) reducir la dosis y aplazar el tratamiento. En cuanto a las consecuencias clínicas, 4 (9.3%) pacientes precisaron un ingreso hospitalario por la toxicidad del tratamiento: 1 caso de neutropenia febril, 1 caso de diarrea grado 4, 1 caso de mucositis grado 3 y trombopenia grado 4 y 1 casos de emesis y diarrea grado 3 e insuficiencia renal.

3.1.2. Toxicidades específicas

La Tabla 47 resume la incidencia de las principales toxicidades en ambas cohortes considerando el grado más severo experimentado a lo largo del tratamiento.

Tabla 47: Incidencia de eventos adversos en cada cohorte

TIPO TOXICIDAD	GRADO	Nº PACIENTES (%)		
		POBLACIÓN TOTAL (n=379)	C.DISEÑO (n=202)	C.VALIDACIÓN (n=177)
DIARREA	No	191 (50.4%)	110 (54.5%)	81 (45.8%)
	Grado 1	111 (29.3%)	52 (25.7%)	59 (33.3%)
	Grado 2	46 (12.1%)	22 (10.9%)	24 (13.6%)
	Grado 3	28 (7.4%)	17 (8.4%)	11 (6.2%)
	Grado 4	3 (0.8%)	1 (0.5%)	2 (1.1%)
MUCOSITIS	No	263 (69.4%)	159 (78.7%)	104 (58.8%)
	Grado 1	86 (22.7%)	31 (15.4%)	55 (31.1%)
	Grado 2	24 (6.3%)	9 (4.4%)	15 (8.5%)
	Grado 3	5 (1.3%)	3 (1.5%)	2 (1.1%)
	Grado 4	1 (0.3%)	0 (0%)	1 (0.5%)
NEUTROPENIA	No	202 (53.3%)	123 (60.9%)	79 (44.6%)
	Grado 1	93 (24.5%)	41 (20.3%)	52 (29.4%)
	Grado 2	55 (14.5%)	21 (10.4%)	34 (19.2%)
	Grado 3	17 (4.5%)	9 (4.5%)	8 (4.5%)
	Grado 4	12 (3.2%)	8 (3.9%)	4 (2.3%)
TROMBOPENIA	No	267 (70.4%)	149 (73.8%)	118 (66.7%)
	Grado 1	82 (21.6%)	39 (19.3%)	43 (24.3%)
	Grado 2	23 (6.1%)	11 (5.4%)	12 (6.8%)
	Grado 3	5 (1.3%)	2 (1%)	3 (1.7%)
	Grado 4	2 (0.6%)	1 (0.5%)	1 (0.5%)
ANEMIA	No	272 (71.8%)	161 (79.7%)	111 (62.7%)
	Grado 1	88 (23.2%)	30 (14.8%)	58 (32.7%)
	Grado 2	11 (2.9%)	5 (2.5%)	6 (3.4%)
	Grado 3	7 (1.8%)	5 (2.5%)	2 (1.2%)
	Grado 4	1 (0.3%)	1 (0.5%)	0 (0%)
NEUROTOXICIDAD	No	73 (19.3%)	53 (26.2%)	20 (11.3%)
	Grado 1	148 (39%)	80 (39.6%)	68 (38.4%)
	Grado 2 < 7 días	40 (10.6%)	22 (10.9%)	18 (10.2%)
	Grado 2 ≥ 7 días	92 (24.3%)	36 (17.8%)	56 (31.6%)
	Grado 3	26 (6.9%)	11 (5.5%)	15 (8.5%)

Resultados

Respecto a la toxicidad leve-moderada, la diarrea grado 1-2 ($p=0.048$), la mucositis grado 1-2 ($p=0.021$), la neutropenia grado 1-2 ($p=0.033$) y la anemia grado 1 ($p=0.001$) fueron significativamente más frecuentes en la cohorte de validación que en la de diseño. En cuanto a la toxicidad severa, la incidencia de neurotoxicidad grado 2 con una duración >7 días y grado 3 fue significativamente superior en la cohorte de validación que en la de diseño ($p=0.001$). No se objetivaron diferencias significativas con respecto al resto de toxicidades \geq grado 3 entre las dos cohortes.

En la cohorte de diseño los pacientes tratados con CAPOX presentaron una incidencia de diarrea grado 3-4 significativamente superior que aquellos tratados con FOLFOX ($p=0.031$), mientras que la neutropenia grado 3-4 fue significativamente superior en los pacientes tratados con FOLFOX ($p=0.021$). La incidencia de neuropatía grado 3-4 fue significativamente superior en las mujeres que en los varones y en los pacientes tratados con FOLFOX que en aquellos que recibieron CAPOX tanto en la cohorte de diseño ($p=0.034$) como en la de validación ($p=0.041$). No se encontró ninguna asociación relevante entre el desarrollo de toxicidad y el pronóstico de los pacientes.

3.2. ANÁLISIS DE LA TOXICIDAD GLOBAL EN FUNCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO ÚNICO

La posible asociación entre los SNPs y el desarrollo de toxicidad severa (grado 3-4) fue analizada inicialmente utilizando una regresión logística univariada, realizándose posteriormente un análisis multivariante considerando las características clínicas relevantes y el tratamiento adyuvante como covariables.

3.2.1. Cohorte de diseño

En la cohorte de diseño se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el SNP XRCC2 rs3218408 T>G y el desarrollo de toxicidad grado 3-4 en el análisis univariante, así como en el análisis multivariante considerando la edad, el sexo, el esquema de QT adyuvante y la dosis acumulada de oxaliplatino. Respecto al SNP MTHFR rs1801133 C>T, se objetivó una tendencia a una mayor toxicidad grado 3-4 en los pacientes portadores homocigotos del genotipo C/C, pero las diferencias no alcanzaron la significación estadística.

A) XRCC2 rs3218408 T>G

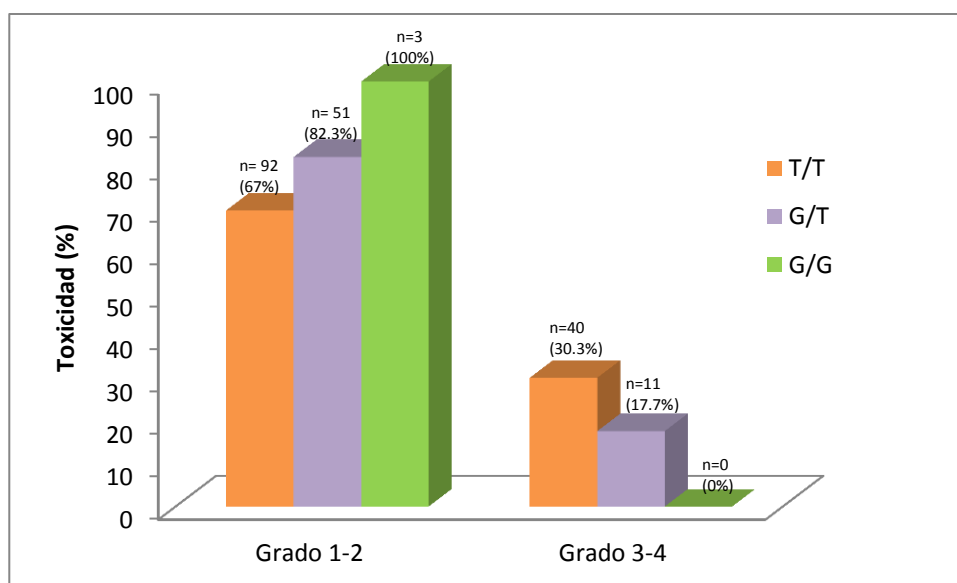
Respecto al SNP XRCC2 rs3218408, 132 (67%) pacientes fueron portadores homocigotos del alelo nativo T (T/T), 62 (31.5%) heterocigotos (T/G) y 3 (1.5%) portadores homocigotos del alelo mutado G (G/G). Los pacientes con el genotipo homocigoto T/T presentaron un riesgo de toxicidad grado 3-4 significativamente superior que el de los portadores heterocigotos u homocigotos del alelo G (30.3% vs. 16.9%, respectivamente; odds ratio (OR): 0.48; IC 95%, 0.23-0.99; p=0.048) (Tabla 48). La Figura 29 muestra la representación gráfica de la toxicidad grado 3-4 en función de los genotipos de este SNP.

Tabla 48: Análisis uni y multivariante de la asociación entre el SNP XRCC2 rs3218408 T>G y la toxicidad grado 3-4 en la cohorte de diseño

VARIABLE	N (%)	Tox. grado 3-4 N (%)	OR	IC 95%	P
UNIVARIANTE					
XRCC2 rs3218408					
T/T	132/197 (67%)	40/132 (30.3%)	1 (Referencia)		
T/G-G/G	65/197 (33%)	11/65 (16.9%)	0.48	0.23-0.98	0.044
MULTIVARIANTE					
XRCC2 rs3218408					
T/T	132/197 (67%)	40/132 (30.3%)	1 (Referencia)		
T/G-G/G	65/197 (33%)	11/65 (16.9%)	0.48	0.23-0.99	0.048
Edad			0.99	0.96-1.02	0.48
Sexo					
Varón	115/202 (56.9%)	25/115 (21.7%)	1 (Referencia)		
Mujer	87/202 (43.1%)	27/87 (31.1%)	1.46	0.76-2.80	0.26
QT adyuvante					
CAPOX	151/202 (74.7%)	33/151 (21.8%)	1 (Referencia)		
FOLFOX	51/202 (25.3%)	19/51 (37.2%)	1.89	0.92-3.91	0.085
Dosis acumulada de oxaliplatino			1.07	0.99-1.12	0.851

Resultados

Figura 29: Toxicidad grado 3-4 en función del SNP XRCC2 rs3218408 T>G en la cohorte de diseño



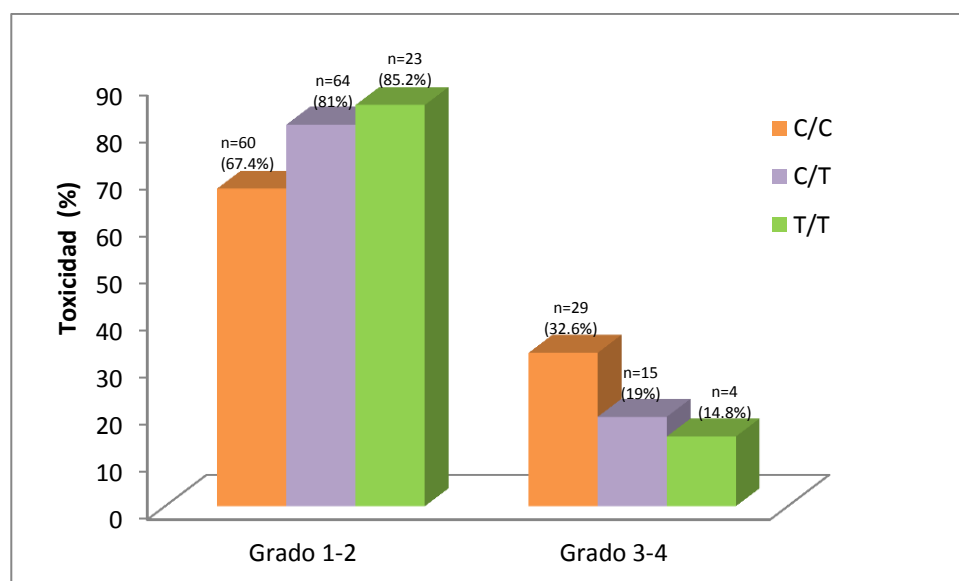
B) MTHFR rs1801133 C>T

En el caso del SNP MTHFR rs1801133 C>T, 89 (45.6%) pacientes fueron portadores homocigotos del alelo nativo C, 79 (40.5%) heterocigotos (C/T) y 27 (13.9%) homocigotos del alelo mutado T (T/T). La incidencia de toxicidad grado 3-4 fue superior en los pacientes con el genotipo C/C que en aquellos portadores de los genotipos C/T o T/T, pero las diferencias no alcanzaron la significación estadística (32.6% vs. 17.9%, respectivamente; OR: 0.59; IC 95%, 0.31-1.27; $p=0.109$) (Tabla 49). La Figura 30 representa la gráfica de toxicidad grado 3-4 en función de los genotipos de este SNP.

Tabla 49: Análisis uni y multivariante de la asociación entre el SNP MTHFR rs1801133 C>T y la toxicidad grado 3-4 en la cohorte de diseño

VARIABLE	N (%)	Tox. grado 3-4 N (%)	OR	IC 95%	P
UNIVARIANTE					
MTHFR rs1801133					
C/C	89/195 (45.6%)	29/89 (32.6%)	1 (Referencia)		
C/T-T/T	106/195(54.4%)	19/106 (17.9%)	0.6	0.32-1.13	0.115
MULTIVARIANTE					
MTHFR rs1801133					
C/C	89/195 (45.6%)	29/89 (32.6%)	1 (Referencia)		
C/T-T/T	106/195(54.4%)	19/106 (17.9%)	0.59	0.31-1.27	0.109
Edad			0.99	0.96-1.02	0.51
Sexo					
Varón	115/202 (56.9%)	25/115 (21.7%)	1 (Referencia)		
Mujer	87/202 (43.1%)	27/87 (31.1%)	1.53	0.79-2.94	0.205
QT adyuvante					
CAPOX	151/202 (74.7%)	33/151 (21.8%)	1 (Referencia)		
FOLFOX	51/202 (25.3%)	19/51 (37.2%)	1.88	0.91-3.88	0.087
Dosis acumulada de oxaliplatino			1.07	0.99-1.02	0.94

Figura 30: Toxicidad grado 3-4 en función del SNP MTHFR rs1801133 C>T en la cohorte de diseño



Resultados

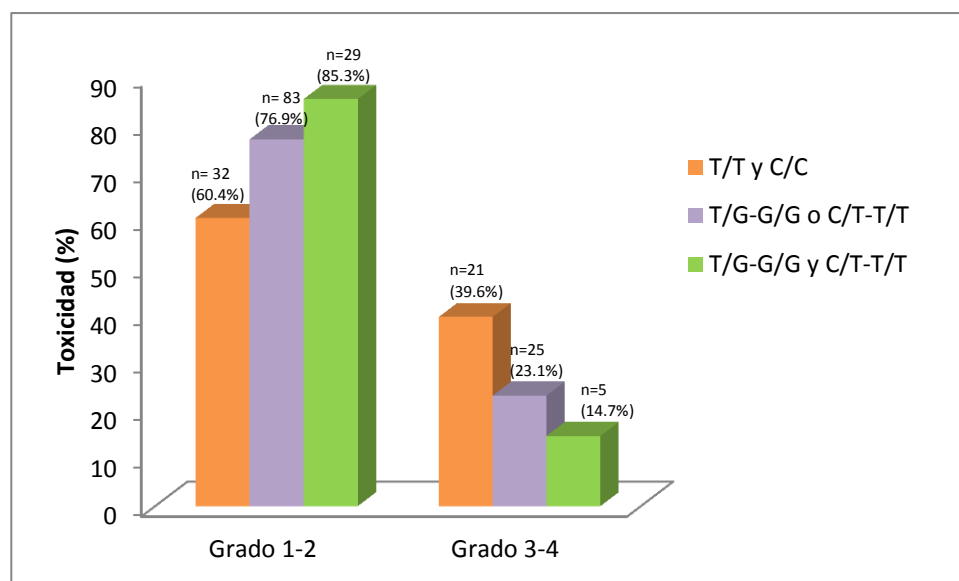
C) Combinación XRCC2 rs3218408 T>G y MTHFR rs1801133 C>T

Finalmente, se evaluó la posible asociación entre la toxicidad severa y la combinación de los SNP XRCC2 rs3218408 T>G y MTHFR rs1801133 C>T. Un total de 53 (27.2%) pacientes presentaron la combinación de los genotipos XRCC2 T/T y MTHFR C/C, 108 (55.4%) los genotipos XRCC2 T/G-G/G o MTHFR C/T-T/T y 34 (17.4%) pacientes los genotipos XRCC2 T/G-G/G y MTHFR C/T-T/T. En el análisis combinado, se objetivó una toxicidad grado 3-4 significativamente superior en los portadores de XRCC2 T/T y MTHFR C/C (39.6%) que en aquellos con la combinación XRCC2 T/G-G/G o MTHFR C/T-T/T (23.1%) o XRCC2 T/G-G/G y MTHFR C/T-T/T (14.7%) tanto en el análisis univariante como en el multivariante considerando la edad, el sexo, el esquema de QT adyuvante y la dosis acumulada de oxaliplatino como covariables (Tabla 50 y Figura 31).

Tabla 50: Análisis uni y multivariante de la asociación entre los SNP XRCC2 rs3218408 T>G y MTHFR rs1801133 C>T y la toxicidad grado 3-4 en la cohorte de diseño

VARIABLE	N (%)	Tox. grado 3-4 N (%)	OR	IC 95%	P
UNIVARIANTE					
XRCC2+MTHFR					0.024
T/T y C/C	53/195 (27.2%)	21/53 (39.6%)	1 (Referencia)		
T/G-G/G o C/T-T/T	108/195 (55.4%)	25/108 (23.1%)	0.44	0.22-0.89	0.022
T/G-G/G y C/T-T/T	34/195 (17.4%)	5/34 (14.7%)	0.29	0.11-0.83	0.021
MULTIVARIANTE					
XRCC2+MTHFR					0.028
T/T y C/C	53/195 (27.18%)	21/53 (39.62%)	1 (Referencia)		
T/G-G/G o C/T-T/T	108/195 (55.38%)	25/108 (23.15%)	0.45	0.22-0.92	0.030
T/G-G/G y C/T-T/T	34/195 (17.44%)	5/34 (14.71%)	0.29	0.10-0.83	0.021
Edad			0.97	0.91-1.02	0.56
Sexo					
Varón	115/202 (56.93%)	25/115 (21.74%)	1 (Referencia)		
Mujer	87/202 (43.07%)	27/87 (31.03%)	1.49	0.77-2.88	0.24
QT adyuvante					
CAPOX	151/202 (74.75)	33/151 (21.85%)	1 (Referencia)		
FOLFOX	51/202 (25.24)	19/51 (37.25%)	1.92	0.92-4.01	0.08
Dosis acumulada de oxaliplatino			1.01	0.99-1.01	0.97

Figura 31: Toxicidad grado 3-4 en función de la combinación de los SNP XRCC2 rs3218408 T>G y MTHFR rs1801133 C>T en la cohorte de diseño



3.2.2. Cohorte de validación

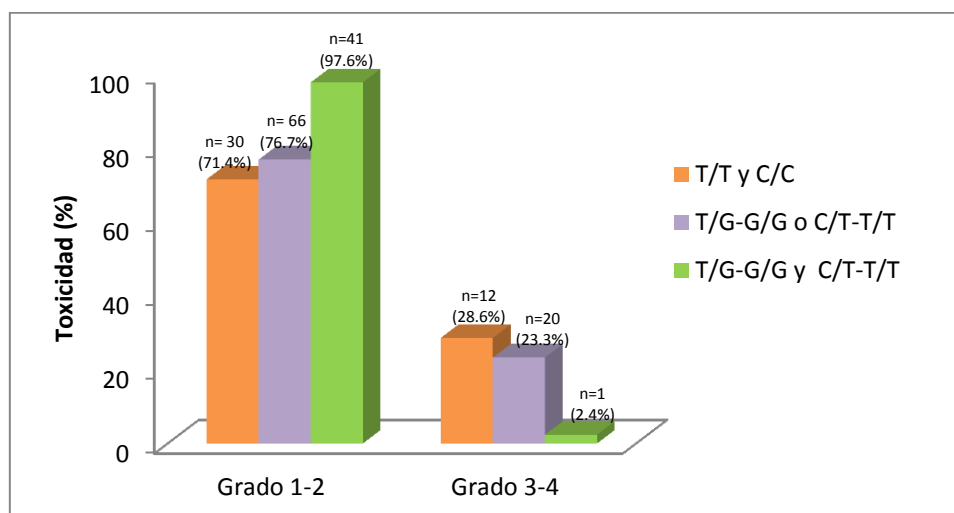
La capacidad de predecir toxicidad grado 3-4 de la combinación de los SNPs XRCC2 rs3218408 T>G y MTHFR rs1801133 C>T evidenciada en la cohorte de diseño se confirmó en la cohorte de validación tanto en el análisis univariante como en el multivariante considerando la edad, el sexo, el esquema de QT adyuvante y la dosis acumulada de oxaliplatino (Tabla 51). Un total de 42 (24.7%) pacientes presentaron la combinación de los genotipos XRCC2 T/T y MTHFR C/C, 86 (50.6%) los genotipos XRCC2 T/G-G/G o MTHFR C/T-T/T y 42 (24.7%) pacientes la combinación de los genotipos XRCC2 T/G-G/G y MTHFR C/T-T/T. La incidencia de toxicidad grado 3-4 fue significativamente superior en los pacientes con los genotipos XRCC2 T/T y MTHFR C/C (28.6%) que en aquellos portadores de la combinación XRCC2 T/G-G/G o MTHFR C/T-T/T (23.3%) o XRCC2 T/G-G/G y MTHFR C/T-T/T (2.4%) ($p=0.028$) (Figura 32).

Resultados

Tabla 51: Análisis de la asociación entre los SNP XRCC2 rs3218408 T>G y MTHFR rs1801133 C>T y la toxicidad grado 3-4 en la cohorte de validación

VARIABLE	N (%)	Tox. grado 3-4 N (%)	OR	IC 95%	P
UNIVARIANTE					
XRCC2+MTHFR					0.029
T/T y C/C	42/170 (24.7%)	12/42 (28.6%)	1 (Referencia)		
T/G-G/G o C/T-T/T	86/170 (50.6%)	20/86 (23.3%)	0.77	0.43-1.18	0.241
T/G-G/G y C/T-T/T	42/170 (24.7%)	1/42 (2.4%)	0.063	0.01-0.51	0.011
MULTIVARIANTE					
XRCC2+MTHFR					0.028
T/T y C/C	42/170 (24.7%)	12/42 (28.6%)	1 (Referencia)		
T/G-G/G o C/T-T/T	86/170 (50.6%)	20/86 (23.3%)	0.71	0.49-1.11	0.238
T/G-G/G y C/T-T/T	42/170 (24.7%)	1/42 (2.4%)	0.049	0.01-0.41	0.006
Edad			0.97	0.94-1.01	0.187
Sexo					
Varón	115/202 (56.9%)	25/115 (21.7%)	1 (Referencia)		
Mujer	87/202 (43.1%)	27/87 (31%)	1.31	0.56-2.88	0.51
QT adyuvante					
CAPOX	151/202 (74.8)	33/151 (21.8%)	1 (Referencia)		
FOLFOX	51/202 (25.2)	19/51 (37.2%)	0.49	0.19-0.95	0.04
Dosis acumulada de oxaliplatino			1.01	0.99-1.01	0.47

Figura 32: Toxicidad grado 3-4 en función de la combinación de los SNP XRCC2 rs3218408 T>G y MTHFR rs1801133 C>T en la cohorte de validación



VI. DISCUSIÓN

1. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

Aunque en la actualidad se recomienda la administración de QT adyuvante basada en oxaliplatino y fluoropirimidinas en los pacientes con CC estadio III y en un grupo seleccionado de estadios II con factores de riesgo¹⁰⁻¹⁴, en la práctica clínica la mayor parte de los pacientes no se benefician de dicho tratamiento, bien porque se logrará la curación con la cirugía exclusivamente o porque se producirá una recidiva a pesar de su administración. Por lo tanto, es esencial mejorar la capacidad pronóstica del sistema de estadiaje TNM¹⁵⁻²⁰ y de los factores clínico-patológicos clásicos^{15,21-29} mediante la identificación de marcadores que permitan individualizar el tratamiento en función del riesgo de recidiva. Además, se debe tener en cuenta que el 30-40% de los enfermos presentará eventos adversos grado 3-4 y el 0.5-1% complicaciones fatales relacionadas con la terapia adyuvante¹⁰⁻¹², por lo que la identificación de factores predictivos del desarrollo de toxicidad permitiría mejorar la relación riesgo/beneficio identificando aquellos casos que requerirán ajustes de dosis o intensificación del tratamiento de soporte.

En los últimos años se ha estudiado el valor pronóstico y predictivo de varios marcadores moleculares³⁰⁻³⁵, obteniendo resultados prometedores pero sin clara aplicabilidad clínica, con la excepción de la IMS como factor de buen pronóstico^{30-32,233,234,257,307-310,355-366} y predictivo^{30,31,234,304,310,356,365} de resistencia a fluoropirimidinas en pacientes con CC estadio II. Además, el conocimiento de las interacciones entre el tumor y el huésped en el proceso de carcinogénesis pone de manifiesto que la variabilidad genética puede contribuir a explicar las diferencias interindividuales en el pronóstico de la enfermedad, la respuesta a la QT o la presencia de eventos adversos. Por ello, numerosos estudios farmacogenómicos recientes han evaluado los polimorfismos en ciertos genes implicados en el metabolismo y transporte de los agentes quimioterápicos u otras vías oncogénicas relevantes, pero los resultados obtenidos no han sido concluyentes³⁶⁻⁴⁵.

En este trabajo se ha estudiado el impacto en el pronóstico o en el desarrollo de eventos adversos de varios SNPs en genes implicados en el metabolismo del oxaliplatino y las fluoropirimidinas, los mecanismos de reparación del ADN, el transporte de fármacos, la angiogénesis u otras vías moleculares en pacientes con CC estadio II de alto riesgo y estadio III tratados con QT adyuvante basada en oxaliplatino y fluoropirimidinas. Se ha demostrado que ciertos SNPs en los genes SELE, MTHFR o XRCC2 se asocian con el riesgo de recaída o la toxicidad y que los resultados pueden

Discusión

validarse en una cohorte independiente de pacientes tratados con los mismos esquemas de QT adyuvante.

En esta discusión analizaremos inicialmente las limitaciones inherentes a la metodología empleada; seguidamente, se discutirán los resultados obtenidos y, por último, se expondrán las perspectivas futuras en este campo.

2. DISCUSIÓN DE LA METODOLOGÍA

2.1. DISEÑO ÓPTIMO DE LOS ESTUDIOS FARMACOGENÓMICOS

La Figura 33 resume los pasos necesarios para optimizar el diseño de los estudios farmacogenómicos con el objetivo de detectar asociaciones reales entre las variantes genéticas y determinados fenotipos⁴²⁷:

Figura 33: Principales pasos en el diseño de estudios farmacogenómicos



En los siguientes apartados se discutirán los principales aspectos relacionados con la metodología de los estudios farmacogenómicos aplicados a nuestro trabajo.

2.2. ELECCIÓN DE LAS COHORTE DE ESTUDIO Y OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Aunque una de las limitaciones potenciales de nuestro estudio podría ser su naturaleza retrospectiva, la evaluación de su objetivo principal, la SLE, no se ve afectada por este aspecto. Además, la evaluación de la toxicidad se ha llevado a cabo utilizando escalas validadas y homogéneas para intentar garantizar la calidad de la recogida de los datos en los distintos hospitales participantes. La gran mayoría de estudios farmacogenómicos realizados en CCR tienen un carácter retrospectivo y sólo 7 ensayos clínicos randomizados^{438,476,489,493,494,526,544}, 3 de ellos en estadios iniciales^{438,476,544}, han incorporado el análisis de polimorfismos. En el contexto adyuvante, Cecchin et al. han evaluado de forma prospectiva la posible asociación entre 57 polimorfismos en genes relacionados con el metabolismo del oxaliplatino y el desarrollo de toxicidad en pacientes con CC estadios II-III tratados con FOLFOX4 adyuvante⁴¹. Los estudios farmacogenómicos integrados en ensayos clínicos prospectivos que se han realizado hasta la fecha^{438,544,474,476} también se han centrado en evaluar la asociación entre estas variantes y el desarrollo de toxicidad en pacientes con estadios II-III. Lee et al. encontró una mayor incidencia de eventos adversos \geq grado 3 en pacientes con CC estadio III tratados con FOLFOX/FOLFIRI adyuvante portadores de las variantes DPD*2A y D949V⁵⁴⁴. En el estudio QUASAR2, de los 36 polimorfismos analizados, sólo cuatro variantes en DPD (2846 T>A y *2A) y TS (5'-UTR TSER*2/TSER*3 y 3'-UTR 1494del6pb) se relacionaban con una mayor incidencia de toxicidad global grado ≥ 3 en 927 pacientes randomizados a recibir capecitabina o capecitabina+bevacizumab⁴³⁸. Sin embargo, en el análisis farmacogenómico llevado a cabo en el contexto del estudio TOSCA no se encontró una asociación relevante entre ninguno de los 17 SNPs estudiados y la toxicidad en 517 pacientes tratados con FOLFOX4 o CAPOX adyuvante⁴⁷⁶.

Respecto a la procedencia de la muestra, la mayor parte de los estudios farmacogenómicos utilizan sangre periférica por ser una fuente fácilmente accesible para la extracción de ADN. Aunque el empleo de muestras parafinadas no se considera de elección, se puede contemplar su uso cuando la calidad del ADN es adecuada, el porcentaje de errores de genotipado bajo y cuando no existen mutaciones, deleciones o amplificaciones relevantes en las regiones de interés de los

genes estudiados^{427,930,931}. En este sentido un aspecto importante a considerar en nuestro trabajo es que el proceso de genotipado se llevó a cabo a partir de ADN extraído de muestras tumorales y peritumorales fijadas en formol y conservadas en parafina, por ser una fuente también de fácil acceso y casi infinita de material genético. Además, al ser el modo rutinario de almacenamiento de las muestras patológicas en los hospitales, se amplía la posibilidad de analizar multitud de casos tratados a lo largo de amplios periodos de tiempo, incluso en distintos centros. Aunque la idoneidad de las muestras parafinadas para los estudios farmacogenómicos se considera controvertida y pueden plantearse problemas en relación con la extracción de ADN de suficiente calidad para llevar a cabo la amplificación del mismo, la tasa de genotipado exitoso en nuestro estudio fue de al menos el 90% en todos los SNPs analizados en ambas cohortes, con la excepción del SNP XRCC1 rs12611088 en la cohorte de diseño (82.6%). No se dispone de datos acerca del porcentaje de resultados indeterminados en relación con las limitaciones del análisis de ADN en los estudios en CCR que han empleado también este tipo de muestras^{44,45,560,562,762,765,922}. El análisis de polimorfismos en tejido tumoral también implica la imposibilidad de corregir el efecto potencial de la pérdida de heterocigosidad (LOH)⁹²⁴, lo cual podría dar lugar a un menor número de sujetos heterocigotos de lo esperado. Sin embargo, en el 95%-99% de los SNPs analizados en nuestro estudio se encontró concordancia entre los genotipos en el tejido tumoral y en la mucosa sana adyacente. Además, el hecho de que la distribución de genotipos en nuestra población se encontrara en EHW con las frecuencias genotípicas documentadas en la literatura sugiere que la LOH no desempeña un papel relevante en esta cohorte. Finalmente, aunque la presencia de cambios preneoplásicos en el tejido peritumoral podría dificultar el genotipado de los SNPs, el porcentaje de concordancia descrito entre tumor y tejido sano adyacente sugiere que estos cambios no comprometen de forma significativa nuestros resultados.

2.3. DEFINICIÓN DEL FENOTIPO DE INTERÉS

La selección de los fenotipos de interés clínico es un paso crucial en el desarrollo de los estudios farmacogenómicos. Los más habituales son la evaluación de la eficacia del tratamiento a través de la tasa de respuestas, la SLE/SLP y la SG o el análisis de la toxicidad del tratamiento y su severidad⁴²⁷.

El objetivo principal de nuestro estudio fue analizar la asociación potencial entre los SNPs en genes implicados en el metabolismo y/o detoxificación del oxaliplatino y las fluoropirimidinas y otras vías relevantes en el proceso de carcinogénesis y el

pronóstico de los pacientes determinado por la SLE. Aunque clásicamente el parámetro de elección para definir el beneficio de la QT adyuvante en CC ha sido la SG por presentar la ventaja de ser sencillo de determinar e interpretar y clínicamente relevante, precisa un seguimiento prolongado para poder concluir que un tratamiento es efectivo. Además, los resultados pueden verse condicionados por los avances en el tratamiento de las recaídas, incluyendo la posibilidad de cirugías de rescate y el desarrollo de nuevos fármacos, y no reflejar el beneficio específico de la QT adyuvante. Por todos estos motivos, la identificación en los ensayos clínicos de un objetivo primario que se correlacione con la SG pero que requiera un seguimiento inferior tiene ventajas obvias, entre las que se encuentran la posibilidad de responder con más rapidez a la cuestión planteada por el estudio y, por tanto, de acelerar la potencial aprobación y disponibilidad del fármaco. En este contexto, los resultados de un análisis llevado a cabo por el grupo cooperativo Adjuvant Colon Cancer Endpoints (ACCENT)⁹³²⁻⁹³⁴ en el que se evalúan los datos individuales de 20.898 pacientes (33% con estadio II) participantes en 18 estudios randomizados sugieren que la SLE tras 6 de seguimiento es un marcador subrogado válido de la SG a los 5 años en pacientes tratados con los esquemas actuales de QT adyuvante, fundamentalmente aquellos con estadio III. En base a estos datos consideramos la SLE como un parámetro adecuado para evaluar el valor pronóstico de los SNPs en nuestro trabajo.

2.4. SELECCIÓN DE POLIMORFISMOS. METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS FARMACOGENÓMICOS

La metodología general de los estudios farmacogenómicos en Oncología se basa en un diseño caso-control^{426,427,429,430}. Los casos son los pacientes con una respuesta o un efecto adverso definido tras un tratamiento farmacológico, mientras que el grupo control lo constituye una cohorte de pacientes con similar tratamiento pero que no experimenta el efecto. Se distinguen dos aproximaciones fundamentales: la aproximación de los genes candidatos y la genómica global^{426,427,429,430,930,935-938}.

2.4.1. Aproximación de los genes candidatos

Los SNPs evaluados en este trabajo, al igual que ocurre en la gran mayoría de los estudios farmacogenómicos llevados a cabo hasta la fecha en Oncología, han sido seleccionados mediante una estrategia de genes candidatos. Esta aproximación se fundamenta en el análisis de un número limitado de genes cuya selección viene determinada por el conocimiento *a priori* de la biología de los procesos neoplásicos,

por lo que pueden perderse potenciales regiones de asociación no conocidas. Su fundamento reside en la hipótesis de que las variaciones genéticas en genes que codifican proteínas implicadas en la absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) de los agentes antitumorales, los sistemas de transporte, la reparación del ADN, así como los efectores de las vías de señalización intracelular o las principales dianas terapéuticas^{426-429,930} podrían condicionar la eficacia del fármaco y/o su toxicidad^{427,428}. También es posible llevar a cabo análisis de asociación de vías de señalización, en los que se estudia la posible asociación con el fenotipo de polimorfismos en varios genes implicados en una vía metabólica determinada^{939,940}. Un hallazgo positivo es fácil de interpretar y proporciona información clínicamente relevante. Sin embargo, los resultados negativos son frecuentes y pueden explicarse por diversos motivos entre los que se encuentran un tamaño muestral pequeño para detectar una relación causal, errores de genotipado, no inclusión del polimorfismo responsable, errores en el estudio del fenotipo o ausencia real de asociación causal.

Este planteamiento puede tener un éxito razonable en la identificación de variantes genéticas significativas en fenotipos específicos (por ejemplo, el metabolismo de los fármacos o los mecanismos de acción de los mismos). Sin embargo, otros fenotipos clínicamente relevantes, como la respuesta a los agentes antineoplásicos o su toxicidad, son más complejos, por lo que el efecto de una única alteración genética puede no ser suficiente para explicar las diferencias interindividuales existentes y es probable que varios genes o vías moleculares estén implicados en los mismos. Por lo tanto, teniendo en cuenta que los tratamientos oncológicos actúan sobre dianas múltiples, en lugar de buscar un “efecto genético dramático” producido por un único gen, probablemente sea más realista considerar un modelo multigénico en el que cada variante génica ejerza un efecto moderado, pero que en conjunto, expliquen las diferencias entre pacientes. Además, las funciones de muchos de los 20.000-25.000 genes del genoma humano no se conocen con exactitud en la actualidad^{426-428,941,942}. Por ello, debe considerarse una aproximación más amplia para resolver estas cuestiones. Un problema adicional de la mayoría de los estudios basados en esta aproximación es su naturaleza unicéntrica y retrospectiva, que condicional una alta tasa de resultados falsos positivos y explica el fracaso a la hora de validar la mayor parte de los marcadores identificados^{427,430,928,934,936}.

2.4.2. Aproximación genómica global

Los rápidos avances en las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento junto con la reducción de los costes y de los tiempos de espera ha permitido el desarrollo en los últimos años de dicho abordaje^{938,942}. A diferencia del estudio de los genes candidatos, la aproximación genómica global permite un análisis completo y no sesgado del genoma humano en búsqueda de posibles polimorfismos relacionados con la eficacia y toxicidad de los agentes antineoplásicos. Estos estudios de asociación del genoma completo (*genome-wide association studies*, GWAS) requieren una tecnología de genotipado de alto rendimiento con capacidad para analizar múltiples SNPs simultáneamente, así como herramientas bioinformáticas avanzadas para el manejo de la información generada. El número de SNPs analizados oscila entre varios miles hasta varios millones en los estudios más recientes, la mayoría de los cuales son SNPs comunes con una prevalencia poblacional >5-10%. Hasta la fecha se ha utilizado en Oncología fundamentalmente para identificar SNPs asociados con la susceptibilidad a desarrollar un tumor, aunque la reducción del tiempo de análisis y del coste ha permitido llevar a cabo estudios en los que se han identificado variantes relacionadas con la eficacia y toxicidad de los tratamientos oncológicos^{930,936,938,942}.

El abordaje genómico global, a diferencia de la aproximación por genes candidatos, no está basado en una hipótesis conocida, por lo que los estudios no están sesgados por el conocimiento previo acerca del mecanismo de acción de los fármacos o de los genes implicados en su farmacocinética/farmacodinámica. Por lo tanto, permite identificar genes previamente considerados irrelevantes, así como múltiples variantes génicas poco frecuentes que contribuyen a determinar o modificar un fenotipo de interés o a explicar rasgos clínicos complejos, por lo que puede considerarse su utilización cuando el conocimiento acerca de la relación variante génica-efecto del fármaco es limitado. Sin embargo, esta metodología tiene algunas desventajas, como el mayor coste, la inclusión de sesgos de selección tanto en los casos como en los controles y un riesgo relativamente elevado de resultados falsos positivos y falsos negativos, lo cual es una causa importante de fracaso en la replicación de los resultados^{426,430,935,936,938,943}. El gran número de SNPs analizados en los estudios GWAS implica la necesidad de corregir los datos generados mediante procedimientos estadísticos como los tests de comparaciones múltiples⁴⁹, así como la exigencia de valores de p más rigurosos para considerar que un resultado es significativo (corrección de Bonferroni)^{939,944-946}. Además, puesto que no se conoce la magnitud del efecto, generalmente se requieren grandes tamaños muestrales (varios cientos o

incluso miles de pacientes en cada grupo de tratamiento) para detectar variantes comunes con un efecto discreto (OR de 1.2 a 2)^{427,930,938}. Finalmente, su sensibilidad para detectar variantes genéticas infrecuentes es limitada, lo cual puede subsanarse resecuenciando regiones genómicas específicas de interés para identificar la variante alélica causal asociada con un determinado fenotipo⁹⁴⁷.

En CCR varios estudios GWAS⁹⁴⁸⁻⁹⁵⁰ y meta-análisis⁹⁵¹⁻⁹⁵³ llevados a cabo a partir del año 2007 han permitido identificar múltiples loci de susceptibilidad de baja penetrancia asociados con un riesgo modesto de desarrollar esta neoplasia tanto en población europea⁹⁵⁰⁻⁹⁵³ como asiática^{948,949}. Estos análisis han puesto de manifiesto la importancia de algunas vías de señalización, como Wnt⁹⁵² y el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β)^{949,950}. Además, han identificado otros genes cuya implicación en la carcinogénesis colorectal no se conocía previamente, lo cual ha permitido identificar nuevos mecanismos patogénicos en relación con este tumor. Sin embargo, hasta la fecha no se han encontrado variantes génicas relacionadas con la eficacia y la toxicidad de la QT en CCR mediante esta aproximación.

2.5. PROCESO DE GENOTIPADO MEDIANTE LA TECNOLOGÍA iPLEX® Gold MassARRAY (SEQUENOM)

Como se ha comentado previamente el genotipado de los SNPs se llevó a cabo mediante la tecnología iPLEX® Gold MassARRAY (Sequenom), la cual utiliza un software con una eficiencia >95% en el diseño de primers de PCR y extensión y un rendimiento superior a 10000 ensayos por día. Aunque el algoritmo de diseño es el mismo que en el caso de la tecnología Homogeneous MassEXTEND® (hME) convencional, la eficiencia y flexibilidad de las reacciones iPLEX es superior, ya que todos los productos de SBE utilizan terminadores comunes facilitando de esta manera el proceso de reacciones múltiples. Una ventaja importante respecto a hME es la reducción significativa de los sesgos alelo-específicos, lo cual permite utilizar umbrales de detección más estrictos, así como la posibilidad de genotipar un mayor número de muestras en menos tiempo y con un coste reducido⁹²⁸.

Otra diferencia de la tecnología iPLEX® respecto a hME es que en esta última la discriminación alélica se lleva a cabo a través de una reacción de minisequenciación que genera productos alelo específicos que son generalmente entre 1 y 4 bases más largos que el primer original, lo cual permite obtener mayores diferencias de masa entre dichos productos, evitando así el solapamiento de los mismos en el

espectrómetro de masas. Para minimizar el problema de la menor diferencia de masa existente entre los productos de SBE, la tecnología iPLEX incorpora primers de extensión de diferentes longitudes en una única reacción, consiguiendo así que los diferentes productos de extensión sean discriminados adecuadamente⁹²⁸.

2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS

Respecto al análisis estadístico, en los estudios farmacogenómicos es importante considerar potenciales fuentes de heterogeneidad como las variables clínico-patológicas o los tratamientos asociados⁹⁵⁴. Por ello, en nuestro estudio se llevó a cabo un análisis multivariante en el que se incluyeron, además de los SNPs relevantes, las variables relacionadas con el pronóstico y la toxicidad identificadas previamente en el análisis univariante, así como el esquema de QT empleado.

Por otra parte, teniendo en cuenta el gran número de test de asociación que típicamente se llevan a cabo en estos estudios, los resultados positivos deben interpretarse con cautela y siempre se requiere su confirmación en una población independiente^{946,955-957}. En relación con este punto, uno de los aspectos más relevantes de nuestro trabajo es la validación de la asociación entre los SNPs y el pronóstico o la toxicidad en una segunda cohorte de pacientes con CC estadio II-III tratados con los mismos esquemas de QT adyuvante, lo cual refuerza la validez de los hallazgos iniciales, como se discutirá en el siguiente apartado.

3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

3.1. DATOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS, SUPERVIVENCIA Y TOXICIDAD

Dado que el objetivo principal del este trabajo es evaluar el impacto pronóstico y predictivo de toxicidad de un determinado grupo de SNPs, es importante un estudio inicial adecuado de la muestra clínica con la que se correlacionan los resultados.

3.1.1. Supervivencia y factores pronósticos

Los datos de supervivencia de nuestro trabajo (Figuras 10 y 11) no difieren significativamente de los publicados en los grupos de pacientes randomizados a recibir oxaliplatino en los tres grandes ensayos fase III que han demostrado el beneficio de la

QT adyuvante basada en este fármaco (Tabla 4)¹⁰⁻¹². Con una mediana de seguimiento inferior (62.4 y 60.7 meses en la cohorte de diseño y validación, respectivamente) a la de los estudios MOSAIC (81.9 meses)⁹⁷ y NSABP C-07 (96 meses)¹²¹ y ligeramente superior a la del estudio XELOXA (55 meses)¹²², en nuestra serie los pacientes de ambas cohortes presentan una SLE a 3 y 5 años discretamente menor a la de aquellos tratados con oxaliplatino en el estudio MOSAIC (SLE a 3 y 5 años, 80.9% y 73.3%, respectivamente)⁹⁷ y muy similar a la publicada en los estudios NSABP C-07 (SLE a 3 y 5 años, 77.4% y 69.4%, respectivamente)¹²¹ y XELOXA (SLE a 3 y 5 años, 70.9% y 66.1%, respectivamente)¹²². No se han encontrado diferencias relevantes respecto a la SG entre nuestros datos y los publicados en los estudios fase III (SG a 3 años, 89-90%; SG a 5 años, 78-82%)^{97,121,122}.

Como se ha comentado en la introducción, los principales factores pronóstico de recaída descritos en pacientes con CC estadios II-III son el estadio patológico^{15-20,97}, la afectación ganglionar^{84,86,97,121,122} o el número insuficiente de ganglios examinados^{28,29,208-214}, la infiltración linfovascular^{21,267-273} o perineural^{22,23,268,275-277}, la presencia de tumor residual^{239,240}, el CEA preoperatorio elevado^{24,25,122}, la obstrucción o perforación intestinal^{15,97} o la histología pobremente diferenciada^{26,27,97}. Es importante considerar siempre estos parámetros en el diseño de un estudio, ya que pueden resultar factores de confusión en la interpretación de los resultados, especialmente en los trabajos retrospectivos. En este sentido, en nuestra serie se encontró un mayor porcentaje de tumores T4, N2 y estadios III que en los estudios MOSAIC y NSABP C-07, así como una incidencia discretamente superior de obstrucción y perforación intestinal, fundamentalmente en la cohorte de diseño. La distribución del resto de factores adversos no difiere significativamente de la encontrada en estos estudios (Tabla 52)¹⁰⁻¹². En consonancia con los datos publicados, el estadio III, la invasión linfovascular y la perforación intestinal demostraron ser factores pronósticos adversos en la cohorte de diseño (Tablas 33 y 34), mientras que en la cohorte de validación, la invasión linfovascular y perineural y la perforación intestinal se relacionaban también con una supervivencia desfavorable, encontrándose la asociación con el estadio en el límite de la significación estadística (Tablas 35 y 36).

A diferencia de otros estudios farmacogenómicos llevados a cabo en CC estadios II-III tratados con QT adyuvante, en nuestro trabajo se excluyeron los pacientes con IMS-H, por tratarse, como se ha comentado en el apartado 4.1.2, de un grupo con un pronóstico favorable^{30,31,32,233,234,257,307-310,355-366} en el que el beneficio de la adyuvancia, fundamentalmente en los estadios II, no está claramente establecido^{30,31,234,304,310,356,365}.

Tabla 52: Factores pronóstico y supervivencia en pacientes tratados con oxaliplatino en nuestra serie y en ensayos fase III

FC. PRONÓSTICO Y SUPERVIVENCIA	Nº PACIENTES (%)				
	DISEÑO (n=202)	VALIDACIÓN (n=177)	MOSAIC ^{10,97} (n=1123)	NSABP C-07 ^{11,121} (n=1234)	XELOXA ^{12,122} (n=944)
Edad (mediana)	63.82 (23-85)	59.8 (23-76)	61 (19-75)	59 (24-82)	61 (22-83)
ESTADIO					
II	60 (29.7)	45 (25.4)	451 (40.2)	356 (28.85)	1 (<1)
III	142 (70.3)	132 (74.6)	672 (59.8)	878 (71.15)	943 (99.9)
GRADO					
G1	19 (9.4)	41 (23.2)	G1-G2: 934 (83.2)		103 (11)
G2	160 (79.2)	114 (64.4)	G3: 142 (12.6)		658 (70)
G3	23 (11.4)	22 (12.4)	Desconocido: 6 (0.5)		146 (15)
Invasión vascular	88 (43.8)	39 (22)	371 (33.04)	ND	ND
Invasión perineural	72 (35.8)	46 (26)	ND	ND	ND
Obstrucción intestinal	72 (35.8)	46 (26)	201 (17.9)	ND	ND
Perforación intestinal	41 (20.3)	20 (11.3)	78 (6.9)	ND	ND
SLE					
3 años	72.3%	74.5%	73.3%	77.4%	70.9%
5 años	68.5%	67.5%	80.9%	69.4%	66.1%
SG					
3 años	89.1%	89.7%	90.5%	89%	90%
5 años	78%	82%	84.8%	80.2%	77.6%

ND: No disponible

Discusión

3.1.2. Toxicidad

En nuestra serie, el 25% de los pacientes presentaron al menos un efecto secundario grado ≥ 3 , porcentaje similar al de los pacientes tratados con QT adyuvante basada en oxaliplatino en los estudios MOSAIC^{10,97} y NSABP C-07^{11,121} y significativamente inferior al del XELOXA^{12,122}. En cuanto a las toxicidades específicas, se observó una menor incidencia de diarrea grado 3-4 que en los tres estudios de registro y similar a la del estudio TOSCA⁴⁷⁶, así como una incidencia de neutropenia grado 3-4 similar a la del estudio XELOXA^{12,122} y significativamente inferior a la de los estudios MOSAIC^{10,97} y TOSCA⁴⁷⁶. Respecto a la neuropatía inducida por oxaliplatino, no encontramos diferencias relevantes en la incidencia global, aunque el porcentaje de pacientes con toxicidad grado ≥ 3 , fundamentalmente en la cohorte de diseño, fue discretamente inferior en algunos estudios previos^{10,12}. La Tabla 53 compara la incidencia de los eventos adversos más frecuentes entre nuestra serie y los estudios fase III antes comentados.

Tabla 53: Máximo grado de toxicidad en pacientes tratados con oxaliplatino en nuestra serie y en ensayos fase III

TIPO TOXICIDAD Y GRADO	Nº PACIENTES (%)				
	DISEÑO (n=202)	VALIDACIÓN (n=177)	MOSAIC ^{10,97} (n=1108)	NSABP 07 ^{11,121} (n=1234)	XELOXA ^{12,122} (n=944)
TOXICIDAD GLOBAL					
Grado 1-2	56.4%	53.7%	ND	ND	ND
Grado 3-4	25.7%	24.3%	22.6%	26.8%	55%
DIARREA					
Grado 1-2	36.6%	46.9%	45.5%	ND	ND
Grado 3-4	8.9%	7.4%	10.8%	38.1%	19.29%
NEUTROPENIA					
Grado 1-2	30.7%	48.6%	37.8%	ND	ND
Grado 3-4	8.4%	6.8%	41.1%	ND	8.74%
NEUROPATÍA					
Grado 1-2	68.3%	80.2%	79.6%	42%	67%
Grado 3-4	5.5%	8.9%	12.5%	8.4%	11.4%

ND: No disponible

No se encontraron diferencias significativas entre las dos cohortes en cuanto a la toxicidad global grado 1-2 ($p=0.34$) o grado ≥ 3 ($p=0.23$). Respecto a las toxicidades específicas, el porcentaje de pacientes afectados de neurotoxicidad grado 2 de más de 7 días de duración y grado 3 durante el tratamiento fue significativamente superior en la cohorte de validación que en la de diseño ($p=0.001$), lo cual puede explicarse por el esquema de oxaliplatino utilizado más frecuentemente en cada grupo. Así, la mayoría (87.7%) de los pacientes en la cohorte de validación fueron tratados con FOLFOX, esquema asociado con una mayor incidencia y severidad de neuropatía que el esquema CAPOX tanto en esta cohorte (42% y 25%, respectivamente; $p=0.097$) como en dos estudios recientes que han evaluado prospectivamente el desarrollo de neuropatía inducida por oxaliplatino en pacientes sin tratamiento previo en los que se ha administrado este fármaco^{958,959}.

En resumen, a pesar de las diferencias descritas, cabe destacar la concordancia de la mayor parte de datos relativos al pronóstico y toxicidad entre nuestro trabajo y otros estudios, tanto prospectivos como retrospectivos, llevados también a cabo en pacientes con CC estadios II-III tratados con QT adyuvante. Esto implica, pese a tratarse de un trabajo desarrollado en una muestra retrospectiva, una mayor solidez para los resultados obtenidos, ya que proceden de una población de pacientes sin características especiales, representativa por tanto de la práctica clínica.

3.2. CONTEXTUALIZACIÓN DEL ESTUDIO

A pesar de las limitaciones comentadas en los apartados previos de esta discusión, éste es uno de los mayores estudios farmacogenómicos llevados a cabo en una cohorte de pacientes caucásicos con CC estadio II de alto riesgo y estadio III tratados de forma homogénea con QT adyuvante basada en oxaliplatino y fluoropirimidinas. Además, uno de los aspectos más relevantes de este trabajo es que la asociación entre los polimorfismos relevantes y el pronóstico de los pacientes o el desarrollo de toxicidad demostrada en la serie de diseño se ha podido validar en una serie independiente de pacientes tratados con los mismos esquemas de QT adyuvante en el mismo intervalo de tiempo. Pese a que se han encontrado diferencias entre ambas cohortes respecto a algunas características clínico-patológicas, como el grado histológico, la invasión linfovascular y perineural o la perforación intestinal (Tabla 4), o a los esquemas de tratamiento administrados (Tabla 9), no hay diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los genotipos de los SNPs

relevantes en base a estos parámetros en ninguno de los dos grupos. Con respecto a este punto, se debe enfatizar que la capacidad del perfil farmacogenómico de predecir el pronóstico en dos series independientes de pacientes, a pesar de las diferencias mencionadas, refuerza la validez de nuestros resultados, así como la posibilidad de extrapolarlos a poblaciones distintas a aquellas en las que se han generado.

La mayoría de los análisis farmacogenómicos que han evaluado el impacto pronóstico o predictivo de toxicidad de los SNPs en genes implicados en el metabolismo y detoxificación del oxaliplatino y las fluoropirimidinas en CCR o en los sistemas de reparación del ADN se han llevado a cabo en la enfermedad avanzada^{469,478,485,487,525,526,559,612,625,642,658}. Sin embargo, sólo 6 estudios^{41,44,45,476,477,610}, 4 en población caucásica^{41,44,45,476} y 2 en asiáticos^{477,610}, han explorado el impacto de los mismos en pacientes tratados homogéneamente con esquemas de QT adyuvante basados en oxaliplatino. Los resultados obtenidos no han sido concluyentes (Tabla 54). En pacientes caucásicos, dos trabajos retrospectivos han estudiado el valor pronóstico de varios SNPs implicados en los sistemas de reparación del DNA y GSTP1 en CC estadio III^{44,45}. Mientras que Zaanen et al. encontró una SLE más prolongada en portadores de los genotipos ERCC1 rs11615 C/T+T/T y XRCC1 rs25487 A/A⁴⁴, ninguno de los polimorfismos analizados por Fariña-Sarasqueta et al. demostró ser un factor pronóstico significativo⁴⁵. Otros dos trabajos italianos se han centrado en analizar el impacto de estas variantes como potenciales predictores de toxicidad^{41,476}. En el estudio de Cecchin la incidencia de neurotoxicidad grado ≥ 2 fue significativamente superior en pacientes portadores del SNP rs2074087 en ABCC1 y rs3740066, rs1885301, rs4148396 y rs717620 en ABCC2, mientras que los SNPs hMSH6-rs3136228 y XRCC3-rs1799794 se asociaban con un mayor riesgo de neutropenia grado 3-4 y de toxicidad no hematológica grado 3-4, respectivamente⁴¹. Sin embargo, ninguna de las variantes evaluadas en el estudio TOSCA mostró una asociación relevante con el desarrollo de neurotoxicidad o la neutropenia⁴⁷⁶. El mayor estudio farmacogenético en población asiática ha analizado prospectivamente 20 polimorfismos en 292 pacientes coreanos tratados con FOLFOX4 adyuvante⁴⁷⁷. Se objetivó una mayor incidencia de neutropenia grado 3-4 en pacientes con los genotipos MTHFR rs1801133 T/T-ERCC1 rs11615 T/T y de neuropatía grado 2-4 en aquellos con el genotipo XRCC1 rs25487 G/G, mientras que los portadores de los genotipos de TS asociados a bajos niveles de expresión proteica (2R/2R, 2R/3C, 3C/3C) presentaban una SLE desfavorable. Un segundo trabajo en pacientes chinos también demostró que los polimorfismos GSTP1 rs1695, ERCC1 rs11615 y ERCC2 rs17655 se asociaban con una mejor SG⁶¹⁰. A diferencia de nuestro estudio,

ninguno de los trabajos descritos ha incluido una cohorte independiente de pacientes en la que validar el impacto de las asociaciones farmacogenómicas relevantes.

En contraste con estos resultados, en nuestro análisis no se encontró una asociación significativa entre ninguno de estas variantes polimórficas y el pronóstico o el desarrollo de eventos adversos, con la excepción de la relación entre el polimorfismo MTHFR rs1801133 y el riesgo de toxicidad global. Sin embargo, a diferencia del estudio coreano de Lee⁴⁷⁷, fueron los portadores del genotipo C/C los que presentaban una mayor incidencia de eventos adversos. Estas discrepancias entre nuestros resultados y los datos publicados en la literatura pueden explicarse por varios motivos entre los que se encuentran las diferencias en las características de los pacientes y en las dosis o los esquemas de QT administrados, los tamaños muestrales limitados, las diferentes fuentes de material clínico o plataformas tecnológicas empleadas para los estudios farmacogenómicos y la ausencia de una cohorte de validación en la mayoría de los trabajos. Las diferencias étnicas entre poblaciones pueden traducirse en diferentes interacciones farmacogenómicas o activación de vías moleculares alternativas que afectan a la biología y al comportamiento tumoral. En este sentido, varios autores han demostrado que las frecuencias genotípicas de genes relevantes en las vías metabólicas estudiadas presentan importantes variaciones geográficas que pueden también explicar la sensibilidad diferencial a la QT y las diferencias en los perfiles de toxicidad entre pacientes caucásicos y población asiática^{477,550,962,963}. Finalmente, se debe tener en cuenta que la mayoría de los estudios farmacogenómicos hasta la fecha se han centrado en el análisis de uno o unos pocos genes candidatos, cuyo significado clínico es limitado y puede ser inadecuado para predecir el pronóstico, ya que las variaciones en las combinaciones genéticas y la posible interdependencia con otras enzimas con valor pronóstico podría dificultar la obtención de resultados reproducibles y uniformes. Por ello, una aproximación que contempla el estudio combinado de varios SNPs relevantes en genes implicados en el metabolismo de la QT podría ser un modelo más lógico y rentable para explicar las variaciones individuales en el pronóstico y la toxicidad, tal como sugiere nuestro estudio. Este aspecto es incluso más relevante cuando se llevan a cabo análisis farmacogenómicos en pacientes que reciben tratamientos quimioterápicos con 2 o más fármacos dirigidos a vías biológicas independientes, como es el caso de FOLFOX o CAPOX en el tratamiento adyuvante del CC.

Tabla 54: Estudios farmacogenómicos en CC estadios II-III tratados con QT adyuvante basada en oxaliplatino y fluoropirimidinas

ESTUDIO	DISEÑO/POBLACIÓN (N) ESTADIO/TRATAMIENTO	TIPO DE MUESTRA	SNPs ESTUDIADOS	RESULTADOS
Zaanan A⁴⁴ (2014)	Retrospectivo/caucásica (n=210) Estadio III /FOLFOX	Tejido tumoral fresco o parafinado	ERCC1 rs11615, XRCC1 rs25487 y GSTP1 rs1695	Los pacientes portadores de los genotipos ERCC1 C/C y/o XRCC1 G/G+G/A presentan una SLE más prolongada que los portadores de los genotipos ERCC1 C/C y/o XRCC1 G/G+G/A
Ruzzo A⁴⁷⁶ (2014)	Prospectivo (TOSCA)/caucásica (n=517) Estadio II alto riesgo-III/ FOLFOX4 y CAPOX	Sangre periférica	17 SNPs en 11 genes (TS, MTHFR, ERCC1, XRCC1 y 3, XPD, GSTT1, GSTP1, GSTM1, ABCC1, ABCC2)	No asociación entre ninguno de los polimorfismos estudiados y el desarrollo de toxicidad
Cecchin E⁴¹ (2013)	Prospectivo/caucásica (n=144) Estadio II alto riesgo-III/ FOLFOX4	Sangre periférica	57 SNPs en 29 genes	Mayor neuropatía G≥2 con los SNPs ABCC1 rs2074087 y ABCC2 rs3740066, rs1885301, rs4148396 y rs717620. Mayor neuropatía G3-4 en portadores del SNP hMSH6 rs3136228
Lee KH⁴⁷⁷ (2013)	Prospectivo/coreana (n=292) Estadio II alto riesgo-III/FOLFOX	Sangre periférica	20 SNPs en 10 genes (TS,MTHFR,ERCC1,XRCC1, XPD,AGXT,ABCC2,GSTP1, GSTT1 y GSTM1)	Mayor incidencia de neuropatía G3-4 en genotipos MTHFR rs1801133 T/T-ERCC1 rs11615 T/T y de neuropatía G2-4 en XRCC1 rs25487 G/G. SLE desfavorable en genotipos de TS con baja expresión
Li HY⁶¹⁰ (2012)	Retrospectivo/china (n=335) Estadio II-III/FOLFOX6	Sangre periférica	ERCC1 rs11615, ERCC2 rs13181, GSTP1 rs1695	Mejor SG en portadores de GSTP1 Val/Val, ERCC1 C/C y ERCC2 G/G
Fariña-Sarasqueta A⁴⁵ (2011)	Retrospectivo/caucásica (n=98) Estadio III/54% FOLFOX-CAPOX	Mucosa normal parafinada	ERCC1 rs11615, ERCC2 rs13181 y GSTP1 rs1695	No asociación entre los polimorfismos estudiados y la SLE
ESTUDIO GEMCAD (2014)	Retrospectivo/caucásica C.diseño (n=202) y validación (n=177) Estadio II alto riesgo-III/FOLFOX4- CAPOX	Tejido tumoral y mucosa sana parafinada	67 SNPs en 32 genes	Mayor riesgo de recaída en portadores de SNPs SELE rs3917412 G/G y MTHFR rs1801133 T/T. Mayor toxicidad G3-4 en portadores de XRCC2 rs3218408 T/T y MTHFR rs1801133 C/C

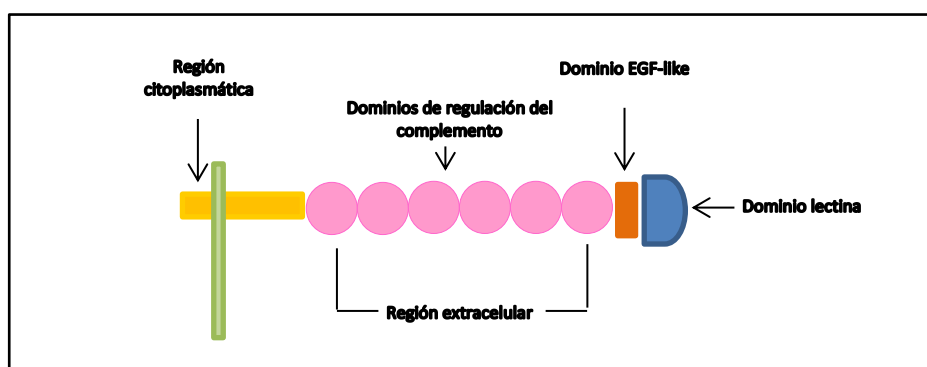
3.3. INTERPRETACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS CON VALOR PRONÓSTICO Y PREDICTIVO DEL DESARROLLO DE TOXICIDAD

3.3.1. E-SELECTINA (SELE) rs 3917412

Este es el primer estudio farmacogenómico en el que se ha demostrado el valor pronóstico independiente de un SNP en la SELE en pacientes con CC estadios II-III tratados con QT adyuvante basada en oxaliplatino.

Las selectinas son una familia de moléculas de adhesión intercelular implicadas en las interacciones tumor-endotelio vascular, por lo que desempeñan un papel esencial en la adhesión y migración de las células tumorales y en la adquisición del fenotipo metastásico⁸³⁴. Los 3 miembros de esta familia, E-, P- y L-selectina, comparten una estructura en mosaico consistente en un dominio amino-terminal tipo lectina seguido de un dominio EGF-like, un número variable de dominios de regulación del complemento, un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico corto⁸³⁵ (Figura 34).

Figura 34: Estructura de la SELE



La SELE o ELAM-1 se expresa en las células endoteliales, leucocitos y plaquetas y es activada por las citoquinas liberadas durante los procesos inflamatorios, por lo que desempeña un papel clave en la adhesión y extravasación de los leucocitos portadores de los ligandos sialil-Lewis^X o sialil-Lewis^A en los tejidos dañados^{841,962}. Varios estudios con líneas celulares y modelos animales sugieren que las células tumorales mimetizan los procesos inflamatorios, expresan estos ligandos e interaccionan con el endotelio vascular por medio de la SELE⁹⁶³⁻⁹⁶⁵. Esta interacción

confiere propiedades metastásicas a dichas células, induciendo su quimiotaxis, promoviendo su extravasación y activando vías de señalización y supervivencia celular como RAS-RAF-ERK-MAPK o PI3K/NF- κ B⁹⁶⁴⁻⁹⁶⁷. Otros trabajos han concluido que la SELE es un potente mediador de la angiogénesis que actúa predominantemente a través de la vía Src-PI3K⁹⁶⁸. Además, se ha demostrado que el CEA es un ligando de la SELE, por lo que su sobreexpresión en las células neoplásicas puede promover la diseminación tumoral⁸³⁹. Algunos estudios han objetivado que los niveles séricos de SELE se encuentran elevados en varios tumores⁸³⁶⁻⁸³⁹, entre ellos el CCR^{836,838}, en los que se asocian con un pronóstico desfavorable. En el caso del CCR también está ampliamente documentada la asociación existente entre la expresión de SELE y sus ligandos (sialil-Lewis^x o sialil-Lewis^A) y el potencial metastásico de las células tumorales^{969,970}. Finalmente, se ha demostrado que la capacidad de las células tumorales de CC de unirse a la SELE expresada en las células endoteliales activadas es directamente proporcional a su capacidad de diseminación⁹⁷¹. Con respecto a este punto, aunque una mayor adhesión de las células tumorales a la superficie endotelial podría teóricamente comprometer su capacidad de migrar a los órganos diana, estudios recientes han demostrado que las células metastásicas que sobreviven pueden proliferar intravascularmente tras la adhesión al endotelio y que la extravasación de las mismas ocurre cuando los focos micrometastásicos intravasculares atraviesan la pared de los vasos en los que se encuentran⁹⁷².

Se han identificado varios SNPs en SELE. El más común, SELE rs5361 A>C, está presente en el 10-15% de la población caucásica. Se localiza en el exón 4 y conlleva la sustitución de una serina sin carga por una arginina con carga positiva (S128R) en el dominio extracelular del receptor (EGF), lo cual incrementa la afinidad de las células inflamatorias y tumorales por sus ligandos en el endotelio vascular^{839,840}. Otros dos polimorfismos relevantes son rs5355 C>T (L554F) y rs1805193 G>T (G98T). El primero de ellos se localiza en el dominio transmembrana de SELE y desempeña un papel importante en el anclaje de la proteína a la membrana plasmática⁴⁸⁵. El SNP rs1805193 se encuentra en la región 5'-UTR del exón 2 y, a diferencia de las dos variantes anteriores, su significado es desconocido⁴⁸⁸. Varios trabajos han demostrado que el SNP SELE rs5361 A>C se asocia con un aumento del riesgo de desarrollar distintas enfermedades caracterizadas por una mayor adhesividad de los leucocitos a las células endoteliales, como la arterioesclerosis⁹⁷³, el infarto de miocardio⁹⁷⁴, los accidentes cerebrovasculares⁹⁷⁵ o las enfermedades autoinmunes^{976,977}. También se ha constatado en algunos estudios *in vitro* en CCR que la presencia de la variante polimórfica puede afectar a las interacciones tumor-endotelio, así como a la motilidad y

a las vías de señalización de las células tumorales, modulando de esta manera el fenotipo metastásico^{838,963,964}. En relación con esto, varios trabajos⁸⁴¹⁻⁸⁴⁵ y meta-análisis⁸⁴⁶ concluyen que el alelo mutado rs5361C aumenta la susceptibilidad a desarrollar distintos tumores y es un factor pronóstico adverso. En CCR, un trabajo italiano que incluye 172 pacientes con tumores estadio I-IV y 80 controles ha demostrado que el alelo 128Arg es más prevalente en los pacientes metastásicos que en aquellos sin metástasis o en los controles sanos, lo cual sugiere que está implicado en la progresión tumoral⁹⁶³. Un segundo estudio francés ha evaluado el valor pronóstico de 3 SNPs en SELE (S128R, G98T y L554F) y 1 SNP en P-selectina (L640V) en 264 pacientes con CC (74.2%) y cáncer de recto (25.4%) estadios II (38.3%) y III (61.7%)⁸⁴⁹. Se administró QT adyuvante en el 44.5% de los pacientes con estadio II (27 casos fluoropirimidinas en monoterapia y 19 tratamiento basado en oxaliplatino) y en el 83.4% de los estadio III (68 fluoropirimidinas y 68 oxaliplatino). Al igual que en el estudio italiano⁹⁶³, la frecuencia de la variante 128R fue significativamente superior en los pacientes con CCR que en los controles sanos. Además, se demostró en el análisis multivariante que el polimorfismo 128Arg se asociaba con una SLE y SG desfavorable tanto en la población global como en los pacientes con estadio II y III considerados por separado. Sin embargo, no se encontró relación entre los restantes SNPs y el pronóstico de los pacientes.

En nuestro estudio no se ha confirmado la asociación del SNP SELE rs5361 con el riesgo de recidiva, pero sí ha podido demostrarse el valor pronóstico de otro SNP, el rs3917412 G>A. Esta variante se localiza en una región intrónica del gen y sus consecuencias funcionales no están completamente definidas. Aunque los mecanismos moleculares precisos por los que ejerce su efecto en las células neoplásicas del colon no se conocen con exactitud y la probabilidad de inducir un efecto biológico en la expresión génica es mayor en el caso de los polimorfismos localizados en regiones exónicas, es posible que aquellos que se encuentran en regiones no exónicas también puedan modular la función de la proteína al afectar a la estructura y estabilidad del mRNA o a la cinética de traducción o mediante mecanismos de splicing alternativos⁹⁷⁷. Una posible explicación del pronóstico desfavorable que en nuestro análisis tienen los pacientes homocigotos para el alelo G podría ser el aumento de la afinidad de la SELE por sus ligandos en las células tumorales en este subgrupo. Además, el alelo ancestral puede incrementar la liberación de la SELE del endotelio vascular, lo que proporciona un estímulo soluble para movilizar las células tumorales hacia sus órganos diana, confiriendo de esta manera un mayor riesgo de diseminación a distancia.

3.3.2. MTHFR rs1801133

Respecto al SNP rs1801133 (677 C>T), los portadores homocigotos y heterocigotos del alelo T presentan una reducción del 65% y 30% de la actividad de la enzima MTHFR, respectivamente, comparado con aquellos con el alelo nativo C⁵⁴⁹. Además, el genotipo T/T se asocia con una reducción de los niveles plasmáticos de folato, un incremento de los niveles de homocisteína y una menor disponibilidad de grupos metilo, lo cual conlleva una regulación génica aberrante^{39,442,674,979,980}. En consecuencia, se ha postulado que los pacientes con las variantes alélicas 677 C/T-T/T podrían presentar una mayor sensibilidad a la QT basada en fluoropirimidinas que aquellos con la variante común 677C, así como un mayor riesgo de toxicidad por una deficiencia en la síntesis y reparación del ADN.

Múltiples estudios, la mayoría llevados a cabo en pacientes con CCR avanzado, han intentado definir el posible valor predictivo del SNP MTHFR rs1801133 C>T en relación con la actividad de las fluoropirimidinas y la toxicidad del tratamiento, con resultados no concluyentes^{40,438,466,467,470,471,474,476,477,483,488,489,493,494,496,497,504,534,547,553-571}. En nuestro trabajo, los pacientes portadores del genotipo 677 T/T presentaron un riesgo de recaída superior. De acuerdo con estos datos, algunos autores también han demostrado un peor pronóstico en los portadores del alelo T^{483,554,563,567}, pero otros estudios no han confirmado la asociación entre este polimorfismo y la supervivencia^{40,466,471,477,485,489,493,497,548,555,556,558,559,561,562,564,568,569,571,642} o incluso han objetivado que el alelo T confiere un pronóstico favorable^{488,534,553,557,560,566} (Tabla 17).

Nuestros resultados no son consistentes con los hallazgos *in vitro* que sugieren una menor actividad enzimática en portadores del genotipo T/T que potenciaría el efecto antitumoral de las fluoropirimidinas^{5551,552,980}. Aunque los resultado de los estudios *in vitro* y los clínicos no deben compararse directamente, si se asume la repercusión funcional del polimorfismo MTHFR rs1801133 C>T, una posible explicación a estos datos podría ser que la disponibilidad celular de 5,10-MTHF no sólo depende del genotipo de la MTHFR sino que las consecuencias fisiopatológicas derivadas de estas variantes pueden modularse por factores demográficos y ambientales como la edad, la ingesta de folato en la dieta, el hábito tabáquico o el consumo de alcohol⁹⁸¹⁻⁹⁸³. Además, algunos estudios poblacionales han sugerido una mayor incidencia de CCR y un peor pronóstico en pacientes con el genotipo T/T⁹⁸⁴, por lo que podría considerarse un factor pronóstico adverso independiente del tratamiento con fluoropirimidinas.

Con respecto a la toxicidad, en nuestro análisis los portadores del genotipo MTHFR C/C presentaron un mayor riesgo de eventos adversos severos. Varios estudios han evaluado la posible asociación entre este polimorfismo y los efectos secundarios del tratamiento con resultados inconsistentes hasta la fecha ^{438,466,474,470,476,477,483,485,488,489,493,494,496,497,504,548,554,555,561,563,565,569}. En consonancia con nuestros resultados, algunos trabajos señalan que la toxicidad grado 3-4 asociada al tratamiento con 5-FU o capecitabina es superior en los portadores del genotipo 677 C/C ^{470,483,548}, pero otros autores no han encontrado asociación ^{438,474,476,485,488,489,493,494,496,497,504,561} o han demostrado una menor toxicidad en portadores del alelo C ^{466,477,554,555,563,565} (Tabla 17).

Varios factores podrían explicar las dificultades a la hora de obtener resultados uniformes y reproducibles en los estudios farmacogenéticos de MTHFR. La inconsistencia de los datos de los modelos experimentales, los mecanismos múltiples de citotoxicidad por fluoropirimidinas y la combinación con otros fármacos, como el oxaliplatino en el caso de nuestro estudio, pueden ser limitaciones importantes a la hora de detectar asociaciones significativas entre las variantes polimórficas y el pronóstico. Respecto a las diferencias geográficas comentadas en el apartado 3.2., un aspecto fundamental a tener en cuenta es la existencia de una importante variabilidad étnica en cuanto a la frecuencia de las variantes alélicas ²⁹⁹. Así, mientras que los estudios en poblaciones caucásicas y asiáticas sugieren que la prevalencia de los genotipos 677 C/T-T/T es del 12-15% y del 50%, respectivamente, la población afroamericana presenta una frecuencia del genotipo T/T muy baja ^{477,550}. Además, teniendo en cuenta la frecuencia del alelo mutado MTHFR 677T, el tamaño muestral limitado de muchos de los trabajos sólo ha permitido estudiar un número limitado de pacientes homocigotos, por lo que es posible que no tengan suficiente poder estadístico como para detectar un posible efecto del genotipo en el pronóstico o la toxicidad. Finalmente, las asociaciones farmacogenómicas no siempre son reproducibles cuando se exploran en contextos clínicos diferentes. Los hallazgos en pacientes con estadios iniciales tratados con QT adyuvante pueden no confirmarse en la enfermedad avanzada. La progresión tumoral es un proceso dinámico, mientras que el perfil farmacogenómico es un retrato estático cuyo impacto clínico puede modularse en mayor o menor medida por los cambios genéticos (mutaciones, aberraciones cromosómicas, pérdida de heterocigosidad, etc) y epigenéticos que se van acumulando en las células tumorales y por los cambios en los distintos factores ambientales.

3.3.3. XRCC2 rs3218408

El gen XRCC2 es un componente esencial de la vía HRR que interacciona con las proteínas RAD51 y RAD51-like. Está implicado en la reparación de las roturas de ADN de doble cadena que tienen lugar durante la replicación del ADN^{663,664}. Este proceso es esencial para mantener la estabilidad genómica, por lo que su funcionamiento defectuoso puede dar lugar a mutaciones en genes críticos para la regulación del crecimiento celular y la apoptosis, errores en la segregación de los cromosomas y otras aberraciones cromosómicas, modulando de esta manera la susceptibilidad a desarrollar distintos tumores y su pronóstico⁶⁶²⁻⁶⁶⁴. Estudios *in vitro* han demostrado que las células XRCC2-deficientes tienen una capacidad de reparar el ADN a través del sistema HRR 100 veces inferior que aquellas con XRCC2 conservado⁶⁶⁴, presentando, además, varias formas de inestabilidad cromosómica descritas con frecuencia en los tumores humanos^{663,985}. También se ha demostrado que XRCC2 juega un papel clave en la reparación del daño en el ADN causado por algunos agentes antitumorales⁹⁸⁶ y la radioterapia⁹⁸⁷, por lo que puede modular la sensibilidad/resistencia al tratamiento antitumoral.

Varios polimorfismos comunes en el gen XRCC2, fundamentalmente el SNP XRCC2 rs3218536 (31479 G>A, Arg188His), han sido identificados como potenciales loci de susceptibilidad en relación con distintos tipos de tumores⁶⁶⁵⁻⁶⁷⁰. En CCR se han llevado a cabo un número limitado de estudios, alguno de los cuales confirman el papel de estos polimorfismos en la tumorigénesis de esta neoplasia^{619,667-670}. Sin embargo, su asociación con el pronóstico o el desarrollo de toxicidad en pacientes con CC tratados con QT adyuvante basada en oxaliplatino no ha podido demostrarse hasta la fecha.

En nuestro trabajo se ha evidenciado que los pacientes con el genotipo homocigoto nativo XRCC2 rs3218408 T>G T/T presentaban un riesgo de toxicidad severa significativamente superior que los portadores homocigotos o heterocigotos del alelo G. La asociación de los genes implicados en la vía HRR con un mayor riesgo de toxicidad por oxaliplatino se explicaría porque las variantes polimórficas pueden conllevar una menor eficiencia en la reparación del daño en el material genético inducido por el fármaco que los genotipos nativos, como atestigua la presencia de niveles de aductos de ADN superiores⁵⁹⁷. Respecto al polimorfismo XRCC2 rs3218408, aunque se localiza en una región intrónica y su relevancia funcional no está establecida, puede contribuir al desarrollo de eventos adversos por su repercusión en la actividad de la correspondiente proteína o su asociación con otros SNPs funcionales, lo cual debe aclararse mediante estudios adicionales.

3.4. VALOR PRONÓSTICO DE LOS SNPs SELE rs3917412 Y MTHFR rs1801133 EN FUNCIÓN DEL ESTADIO Y DEL SEXO

En nuestro trabajo se ha demostrado que la combinación de los SNPs SELE rs3917412 y MTHFR rs1801133 es un predictor farmacogenómico del riesgo de recaída en CC estadio II-III que depende del sexo y del estadio tumoral. Estos resultados son consistentes con otros estudios en los que también se ha comprobado que los polimorfismos en MTHFR o en otros genes implicados en vías de señalización relevantes en la carcinogénesis del CCR son factores pronóstico específicos del sexo^{45,47,48,504,559,568,723,724,889,893,895,921,988} o del estadio^{46,48,989} tanto en los estadios iniciales como en la enfermedad avanzada (Tabla 55).

En este estudio se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa entre el perfil constituido por los genotipos SELE rs3917412G/G y MTHFR rs1801133 T/T y un riesgo de recidiva superior en pacientes con estadio III, observándose, además, una tendencia similar pero no estadísticamente significativa en aquellos con estadio II de alto riesgo. Estos datos respaldan el papel de los dos SNPs como predictores farmacogenómicos del riesgo de recaída en ambos estadios, pero el pequeño tamaño muestral en el caso del estadio II y el hecho de que sólo 3 (5.88%) pacientes en la cohorte de diseño y 2 (4.88%) en la de validación fueran portadores de los polimorfismos SELE G/G+MTHFR T/T limita la capacidad del análisis a la hora de extraer conclusiones definitivas. Además, algunos trabajos recientes indican que determinados biomarcadores moleculares presentan una distribución específica de estadio^{31,46,48,314,989}, lo cual ha llevado a algunos autores a considerar los tumores estadios II y III como entidades diferentes. En este sentido, una explicación posible a nuestros hallazgos podría ser que la expresión o actividad diferencial de la SELE regularía la migración de las células tumorales a los ganglios linfáticos, lo que justificaría un comportamiento biológico diferente en función del estadio.

Aunque los datos publicados no son totalmente concluyentes, se han encontrado diferencias relevantes en función del sexo en cuanto al riesgo y al pronóstico del CCR¹⁶²⁻¹⁶⁵. Se ha descrito una incidencia superior en varones que en mujeres en grandes cohortes sometidas a screening endoscópico sistemático⁹⁹⁰ y algunos trabajos recientes han demostrado que los varones presentan un mayor riesgo de tumores avanzados en todos los grupos de edad⁹⁹¹ y una supervivencia inferior¹⁶⁵. Entre las hipótesis biológicas que podrían explicar estas diferencias, se ha propuesto que el estímulo estrogénico puede ejercer un efecto protector en el desarrollo de CC en

mujeres¹⁶³, ya que la incidencia de esta neoplasia es inferior en población postmenopáusica tratada con estrógenos y progestágenos que en la que no recibe tratamiento hormonal⁹⁹². Además, se han descrito asociaciones claras entre el sexo y determinados marcadores moleculares, como el hecho de que los tumores con IMS-H predominan en mujeres y en colon proximal^{163,164,993}, o la existencia de diferencias genómicas en vías como la TS⁴⁷³, las citoquinas⁹⁹⁴ o la tubulina⁹⁹⁵. En cuanto al papel de los SNPs como marcadores pronósticos dependientes del sexo, en nuestro estudio las mujeres portadoras de los genotipos SELE rs3917412 G/G y MTHFR rs1801133 T/T presentaban una supervivencia desfavorable, sin encontrarse diferencias en los varones. Varios estudios epidemiológicos han concluido que los polimorfismos MTHFR rs1801131 y rs1801133 se asocian con un riesgo de desarrollar CCR u otras neoplasias que difiere en función del sexo⁹⁹⁶. Al igual que en nuestro trabajo, dos estudios en CC avanzado también han demostrado una asociación significativa entre el SNP MTHFR rs1801131 1298 A>C y la SG en mujeres tratadas con QT basada en 5-FU, pero no en varones (Tabla 59)^{559,568}. Sin embargo, en contraste con nuestros datos, el valor pronóstico del SNP rs1801133 C>T no ha podido confirmarse en ninguno de los dos sexos^{559,568}. Los mecanismos biológicos que podrían explicar por qué el sexo afecta a la asociación entre los SNPs en la MTHFR y el pronóstico de los pacientes no están aclarados. Una hipótesis posible sería la interacción entre el estatus estrogénico y los niveles de homocisteína, ya que se han encontrado niveles inferiores en mujeres embarazadas, premenopáusicas y postmenopáusicas en tratamiento hormonal sustitutivo que en varones y en mujeres postmenopáusicas de la misma edad sin tratamiento hormonal⁹⁹⁷. Un estudio prospectivo ha demostrado un efecto significativo de los SNPs MTHFR 1298 A>C y 677 C>T en los niveles de homocisteína, presentando los portadores de los genotipos mutados 1298 C/C y 677 T/T niveles significativamente superiores que aquellos con los alelos nativos⁹⁹⁸. Por lo tanto, se ha postulado que el estatus estrogénico de las mujeres con CC podría interaccionar con el genotipo de la MTHFR a través de una disminución de los niveles de homocisteína, siendo el impacto de esta interacción significativamente menor en varones⁹⁹⁸. Una segunda explicación podría ser que el sexo es un potente predictor del estatus de metilación del gen MTHFR, encontrándose niveles relativos más altos en pacientes varones.

Tabla 55: Estudios farmacogenómicos en CC con análisis estratificado en función del sexo y del estadio

ESTUDIO	POBLACIÓN DE ESTUDIO	RESULTADOS
Bohanes P⁹⁸⁹ (2015)	234 pacientes con CC estadio II-III tratados con QT adyuvante basada en 5-FU	En estadios II, los pacientes con el alelo G del SNP integrina B3 (ITG B3) rs4642 presentaban un tiempo hasta la recaída (TTR) superior (p=0.004). En estadios III el análisis combinado de los SNPs ITG B1 rs2298141 y ITGA4 rs7562323 permite definir subgrupos con distinto TTR (p=0.025)
Ning Y⁴⁸ (2014)	732 pacientes estadios II-III tratados con QT adyuvante basada en 5-FU: 234 diseño (54.3% varones, 45.7% mujeres) y 498 validación (53.8% varones, 46.2% mujeres)	Los SNPs T-plastin (PLS3) rs11342 y L-plastin (LCP1) rs4941543 son factores predictores del TTR que dependen del sexo y del estadio tanto en la cohorte de diseño como en la cohorte de validación.
Benhaim L⁴⁷ (2014)	234 pacientes con CC estadio II de alto riesgo y estadio III tratados con QT adyuvante basada en 5-FU. 127 (54.3%) varones y 107 (45.7%) mujeres	El SNP voltaje-gated sodium channels α -subunit (SCN1A) rs3812718 predice el TTR en función del sexo. Las mujeres con el genotipo T/T (p=0.039) y los varones con C/C (p=0.048) presentaron un TTR inferior
Fariña-Sarasqueta A⁵⁰⁴ (2011)	98 pacientes con CC estadio III tratados con QT adyuvante: 46% fluoropirimidinas, 54% FOLFOX/CAPOX 57 (60%) varones, 39 (40%) mujeres	El genotipo A/A del SNP GSTP1 rs1695 se asocia a una supervivencia cáncer específica (p=0.029) y SG (p=0.0015) significativamente peor en varones que en mujeres
Schwab M⁵⁰⁴ (2008)	683 pacientes tratados con 5-FU en monoterapia 383 (56.1%) varones, 300 (43.9%) mujeres	La heterocigosidad en DPD*2A se asocia a un aumento de la toxicidad en varones (OR=41.8; IC 95%, 9.2-190; p<0.0001), pero no en mujeres (OR=1.33; IC 95%,0.34-5.16; p=0.68)
Paré L⁵⁵⁹ (2008)	187 pacientes con CC estadio IV tratados en 1ª línea con QT basada en fluoropirimidinas 67 (36%) varones, 120 (64%) mujeres	El valor pronóstico del SNP MTHFR 1801131 depende del sexo. Las mujeres portadoras del genotipo A/C tienen una SG inferior (16 meses) que aquellas con los genotipos A/A (42 meses) o C/C (32 meses) (p=0.003). No diferencias en SG en varones en función del genotipo
Zhang W⁵⁶⁸ (2007)	318 pacientes con CC estadio IV tratados en 2ª línea y sucesivas con QT basada en 5-FU 177 (55.6%) varones y 141 (44.3%) mujeres	La asociación del SNP MTHFR 1801131 con el pronóstico depende del sexo. Las mujeres con el genotipo A/A presentan una mejor SG (18.4 meses) que aquellas con los genotipos A/C (13.9 meses) o C/C (15.6 meses) (p=0.038). No diferencias en varones
Press OA⁷²⁹ (2008)	318 pacientes con CCR metastásico tratados con QT basada en 5-FU. 141 (44%) varones, 177 (56%) mujeres	Varones: Mejor SG en portadores de los genotipos EGFR 61 A/A y (CA)n \geq 20. Mujeres: Mejor SG con los genotipos EGFR 61 G/G y (CA)n <20
ESTUDIO GEMCAD (2014)	379 pacientes estadios II-III tratados con QT adyuvante basada en oxaliplatino: 202 diseño (56.9% varones, 43.1% mujeres) y 177 validación (44.6% varones, 55.4% mujeres)	Los SNPs SELE rs3917412 G/G y MTHFR rs1801133 T/T se asocian con un mayor riesgo de recidiva en estadio III (no en estadio II) y en mujeres (no en varones)

4. APLICABILIDAD CLÍNICA DE LOS RESULTADOS Y PERSPECTIVAS FUTURAS

4.1. ESTRATIFICACIÓN DEL RIESGO E INDIVIDUALIZACIÓN DEL TRATAMIENTO ADYUVANTE

Nuestros resultados demuestran que la combinación de los genotipos SELE rs3917412 G>A G/G y MTHFR rs1801133 C>T T/T es un factor pronóstico independiente asociado con un riesgo de recaída y de muerte significativamente superior en dos cohortes de pacientes con CC estadio II de alto riesgo y estadio III tratados con QT adyuvante basada en oxaliplatino y fluoropirimidinas. Además, este trabajo también sugiere que los SNPs XRCC2 rs3218408 T>G T/T y MTHFR rs1801133 C>T C/C pueden ser de utilidad como predictores farmacogenómicos del desarrollo de toxicidad severa en ambas cohortes.

Estos datos son especialmente relevantes porque la predicción del pronóstico en estos pacientes continúa siendo imprecisa, con tasas de supervivencia del 70-85% y 40-80% en estadios II y III, respectivamente²³⁹. Además, aunque en las últimas décadas han tenido lugar avances sustanciales en el tratamiento adyuvante del CC, el beneficio en la mayoría de los pacientes es modesto, mientras que el desarrollo de toxicidad es un hecho frecuente (40-56% neutropenia, 10-20% neuropatía y 10-15% diarrea \geq grado 3 en poblaciones occidentales tratadas con esquemas basados en oxaliplatino), que puede causar retrasos o suspensiones del tratamiento, neurotoxicidad permanente hasta en el 3-5% de los enfermos e, incluso, muertes tóxicas en una minoría de casos. La relevancia es aun mayor en el contexto adyuvante si se tiene en cuenta que se está aplicando una terapia profiláctica en pacientes potencialmente curados. Por ello, y asumiendo las inherentes limitaciones metodológicas de nuestra propuesta, consideramos que el análisis de los polimorfismos SELE rs3917412 y MTHFR rs1801133 puede contribuir a mejorar la capacidad pronóstica de los factores clínicos-patológicos clásicos permitiendo individualizar las estrategias de tratamiento adyuvante en función del riesgo de recidiva. Este estudio permitiría por un lado evitar un tratamiento potencialmente tóxico en enfermos que no se van a beneficiar del mismo, con la consiguiente reducción de la morbilidad y del gasto sanitario de nuestro Sistema Público de Salud y, por otro lado, intensificar los protocolos de seguimiento o considerar la puesta en marcha de estudios clínicos que evalúen el beneficio de nuevas aproximaciones terapéuticas en aquellos pacientes identificados

como de alto riesgo en base al perfil farmacogenómico. Respecto al desarrollo de eventos adversos, el análisis de las variantes XRCC2 rs3218408 y MTHFR rs1801133 también contribuye a predecir el riesgo de toxicidad severa de cada paciente. En consecuencia, y a diferencia del modelo actual en el que las dosis de los fármacos se calculan en función de la superficie corporal y se modifican *a posteriori* en caso de que el paciente experimente eventos adversos relevantes, nuestro estudio permitiría una aproximación más racional mediante la identificación *a priori* de aquellos pacientes que se beneficiarían de un ajuste de dosis, monitorización específica, intensificación del tratamiento de soporte o, incluso en algunos casos, de evitar determinados fármacos. En resumen, nuestros resultados sugieren que el estudio de estos SNPs en pacientes con CC en estadios precoces puede implicar un replanteamiento de las estrategias actuales de tratamiento adyuvante.

4.2. SELE Y MTHFR COMO POTENCIALES DIANAS TERAPÉUTICAS

En segundo lugar, cabe inferir de nuestros resultados que la inhibición de la SELE o de la MTHFR, tanto de forma directa como indirectamente por una de sus vías de señalización, podría ser útil en la terapia de pacientes portadores de variantes polimórficas asociadas a una mayor activación de las mismas. La implicación de algunos polimorfismos de la SELE en la interacción tumor-endotelio vascular, la motilidad y otras propiedades de las células tumorales que modulan el fenotipo metastásico sustenta el potencial valor de esta molécula como diana terapéutica en CCR^{834,835,838,849,963,964}. En los últimos años se han desarrollado varios inhibidores de la selectina, que pueden agruparse en cuatro categorías: moléculas basadas en glicanos, pequeñas moléculas con actividad glicomimética, formas solubles de los ligandos de las selectinas y anticuerpos dirigidos frente la SELE o sus ligandos¹⁰⁰⁰. La primera molécula que se testó fue un tetrasacárido sialil-Lewis^x panhíbidor, cuyo desarrollo se interrumpió precozmente por su baja afinidad y su perfil farmacocinético desfavorable⁸³⁴. También se han evaluado inhibidores glucometabólicos que reducen indirectamente la producción de los ligandos de la selectina mediante la inhibición de algunas glucosiltransferasas, como las implicadas en la O-glicosilación de las mucinas y las fucosiltransferasas^{835,1001}. El tratamiento con un inhibidor disacárido que sirve como señuelo para la síntesis de glicanos implica la reducción de las estructuras sialil-Lewis^x y, en consecuencia, disminuye la capacidad metastásica de las células tumorales¹⁰⁰². Otras pequeñas moléculas glicomiméticas con capacidad de inhibir las

selectinas, como el bimosiamose (TBC-1269), cilexin (CY 1503), efomicine M o pentosano polisulfato sódico, se han testado en modelos de lesiones isquémicas, anemia falciforme, psoriasis y asma y en algunos estudios clínicos con resultados prometedores^{835,1003,1004}. Entre las formas solubles de los ligandos de las selectinas, se ha demostrado que una forma recombinante del ligando-1 de la P-selectina inhibe la migración de los leucocitos *in vivo*, evitando así los fenómenos inflamatorios en varios modelos^{835,1005}. Sin embargo, los ensayos clínicos con este agente se suspendieron precozmente debido a su limitada actividad. Los anticuerpos anti-selectina, a pesar de los interesantes datos en la evaluación preclínica, se han evaluado en pacientes con psoriasis o isquemia cerebral objetivándose mínima actividad⁸³⁴. Finalmente, la heparina no fraccionada y algunas heparinas fraccionadas de bajo peso molecular utilizadas en la clínica son glicosaminoglicanos que inhiben la función de la P-selectina y SELE, reduciendo de forma eficiente la formación de metástasis en modelos experimentales^{1006,1007} y mejorando la supervivencia de algunos pacientes incluidos en ensayos clínicos^{1008,1009}. Su acción antitumoral probablemente también pueda explicarse por la inhibición de vías de señalización iniciadas por factores de crecimiento o de moléculas de adhesión entre las que se encuentran las integrinas¹⁰¹⁰. En base a este racional, se ha propuesto que la heparina en combinación con la terapia sistémica adyuvante tras la cirugía de tumores en estadios iniciales podría reducir el riesgo de diseminación, por lo que en la actualidad se encuentran en marcha ensayos clínicos en CCR evaluando esta cuestión (NCT00967148)¹⁰¹¹.

Respecto a la MTHFR, como se ha comentado en el apartado 5.2.4, juega un papel crítico tanto en el metabolismo del folato como en el de la metionina, resultando esta última esencial para la proliferación de las células neoplásicas por su papel en la síntesis proteica y en las reacciones de transmetilación^{442,547}. Las líneas celulares y los xenógrafos humanos dependen estrechamente de metionina, lo cual se manifiesta por su incapacidad para proliferar en un ambiente deplecionado de este aminoácido y para utilizar eficientemente su precursor metabólico inmediato, la homocisteína¹⁰¹². Puesto que las células no transformadas son independientes de metionina, la inhibición de su metabolismo constituye una oportunidad única de interrumpir selectivamente una vía metabólica específica de las células tumorales. Se ha demostrado que la inhibición de la MTHFR mediante oligonucleótidos antisentido específicos (EX5) se asocia con un aumento de la citotoxicidad *in vitro* y con una reducción *in vivo* del crecimiento de xenógrafos de carcinoma de colon y pulmón humano, potenciándose el efecto por el empleo concomitante de fármacos citotóxicos¹⁰¹³. Además, se han propuesto otras estrategias posibles de inhibición de la MTHFR que hasta la fecha no han sido

evaluadas en tumores humanos. Entre ellas destacan las ribozimas, moléculas de ARN que inhiben específicamente la expresión del ARN mensajero de esta proteína, la proteína MTHFR o fragmentos de la misma biológicamente inactivos que interfieren con la actividad de las formas nativas, los péptidos inhibitorios de la actividad de MTHFR o los anticuerpos anti-MTHFR o específicos de alguno de sus fragmentos¹⁰¹⁴.

El valor terapéutico potencial de la inhibición de estas dianas mediante las estrategias descritas debe ser caracterizado de forma cuidadosa mediante su evaluación en modelos preclínicos y en ensayos clínicos en fases precoces.

4.3. PERSPECTIVAS FUTURAS

A pesar de que en los últimos años se han identificado varios SNPs como potenciales predictores del pronóstico o del desarrollo de toxicidad, la evidencia disponible en la actualidad no es suficiente como para implementar su uso rutinario en la práctica clínica. Como se ha comentado a lo largo de esta discusión, el alto riesgo de resultados falsos positivos derivado de llevar a cabo comparaciones múltiples en muestras con un tamaño limitado^{939,944-946}, los análisis con frecuencia retrospectivos y restringidos al estudio de genes candidatos^{426-429,930} y la ausencia de una cohorte de validación^{946,955-957} en la mayor parte de los trabajos son los principales motivos que explican las dificultades a la hora de obtener resultados consistentes.

Teniendo en cuenta estas limitaciones, se han propuesto una serie de premisas claves que se deben considerar en el diseño de estudios farmacogenómicos de alta calidad⁹³⁰:

1. Recogida y análisis prospectivo de datos. La inclusión de los estudios farmacogenómicos en ensayos clínicos bien diseñados, prospectivos y randomizados representa la situación ideal en la que evaluar la asociación potencial entre las variantes genéticas y el pronóstico o la toxicidad. Presentan varias ventajas como un tamaño muestral amplio para minimizar el riesgo de resultados falsos positivos y negativos y la recogida sistemática de datos de alta calidad acerca del pronóstico y la toxicidad siguiendo escalas de evaluación homogéneas⁴²⁷.
2. Los fenotipos de interés deben ser clínicamente relevantes y estar claramente definidos utilizando criterios estándar internacionales.

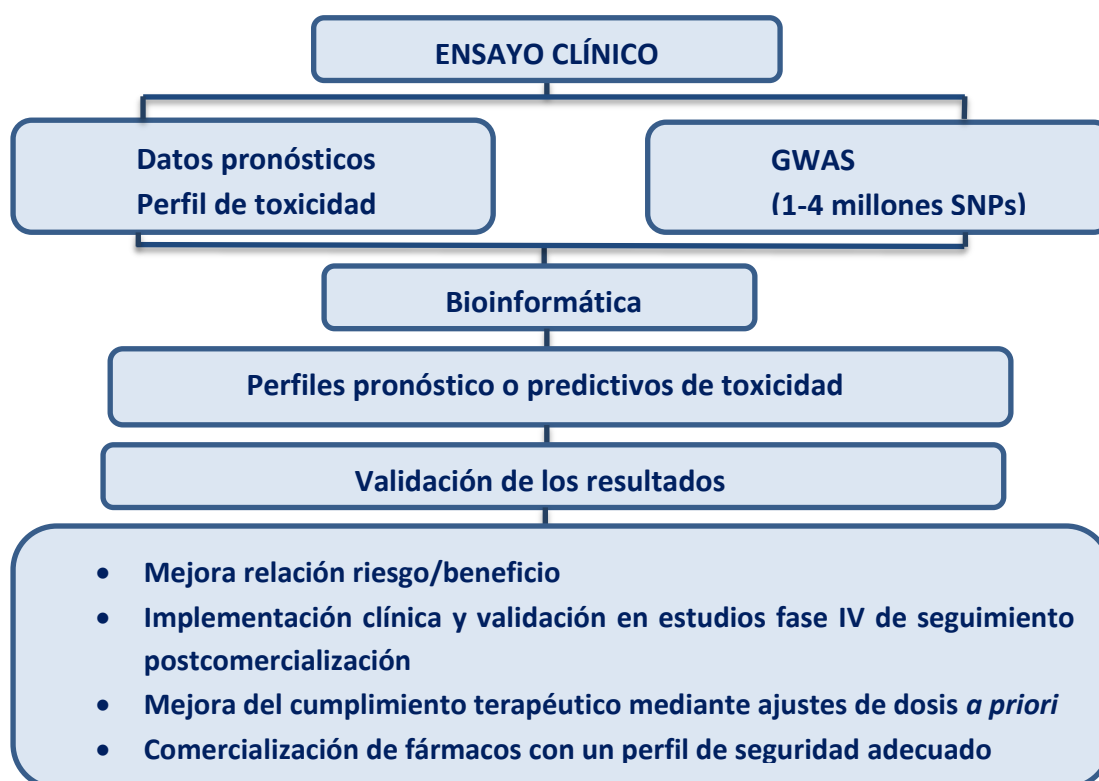
Discusión

3. Los análisis deben incluir la máxima diversidad genómica posible, en lugar de limitarse al estudio de genes implicados en la farmacocinética y la farmacodinámica de los agentes antitumorales. En este punto, la metodología GWAS junto con el empleo de las herramientas estadísticas y bioinformáticas adecuadas constituye el procedimiento de elección en la actualidad para identificar asociaciones relevantes¹⁰¹⁵.

4. El objetivo final de estos estudios debe ser la identificación de perfiles de riesgo constituidos por la combinación de varios SNPs, cuya capacidad predictiva con frecuencia supera a la del análisis independiente de las variantes individuales, como pone de manifiesto nuestro trabajo. Una consideración adicional es si las variantes genéticas que predicen el pronóstico o la toxicidad en relación con un único fármaco mantienen su capacidad predictiva respecto a la combinación de varios agentes. Por ello, una de las prioridades en los estudios farmacogenómicos futuros es el desarrollo de paneles predictivos para esquemas de combinación.

El cumplimiento de estos principios reduciría el riesgo de nuevos falsos positivos y podría ayudar a generar resultados relevantes con repercusión en la práctica clínica. La Figura 35 esquematiza los principales pasos en los estudios de identificación de marcadores farmacogenómicos y su implementación en la práctica clínica.

Figura 35: Paradigma de estudio farmacogenómico e implementación clínica



VII. CONCLUSIONES

1. Las características clínico-patológicas de los pacientes y los datos de supervivencia de nuestro trabajo son comparables a los publicados en los grupos de pacientes tratados con oxaliplatino y fluoropirimidinas en los principales ensayos clínicos fase III en el contexto adyuvante. El estadio III, la invasión linfovascular y la perforación intestinal demostraron ser factores pronósticos adversos independientes en la cohorte de diseño, mientras que en la cohorte de validación, la invasión linfovascular y perineural y la perforación intestinal se relacionaban también con una supervivencia desfavorable, encontrándose la asociación con el estadio en el límite de la significación estadística.
2. En la cohorte de diseño se objetivó un riesgo de recidiva significativamente superior en los portadores de los SNPs SELE rs3917412 G>A G/G y MTHFR rs1801133 C>T T/T que en aquellos con los genotipos SELE G/A-A/A y/o MTHFR C/T-C/C, independientemente de factores pronósticos como el estadio, la invasión linfovascular y la perforación intestinal. La asociación de estos dos SNPs con la SLE se confirmó en la cohorte de validación.
3. La combinación de los SNPs SELE rs3917412 G>A G/G y MTHFR rs1801133 C>T T/T también se asocia con una SG significativamente inferior tanto en la cohorte de diseño como en la de validación, de forma independiente a los factores pronóstico clínico-patológicos.
4. El valor pronóstico de los SNPs SELE rs3917412 G>A G/G y MTHFR rs1801133 C>T T/T es dependiente del sexo y del estadio tumoral. La combinación de estas dos variantes se asocia en ambas cohortes con una SLE inferior en mujeres y en pacientes con estadio III, sin encontrarse diferencias significativas en varones o en estadios II.
5. Se objetivó una incidencia de toxicidad grado 3-4 significativamente superior en los portadores de los SNPs XRCC2 rs3218408 T>G T/T y MTHFR 1801133 C>T C/C que en aquellos con la combinación XRCC2 T/G-G/G o MTHFR C/T-T/T o XRCC2 T/G-G/G y MTHFR C/T-T/T, independientemente de la edad, el sexo, el esquema de QT adyuvante y la dosis acumulada de oxaliplatino. La capacidad de estos dos SNPs de predecir toxicidad severa se confirmó en la cohorte de validación.

6. El análisis de los SNPs SELE rs3917412 G>A, MTHFR rs1801133 C>T y XRCC2 rs3218408 T>G permite estratificar a los pacientes con CC estadio II de alto riesgo y estadio III tratados con QT adyuvante basada en oxaliplatino y fluoropirimidinas en función del riesgo de recidiva o de desarrollar toxicidad severa, mejorando así la capacidad pronóstica de las variables clínico-patológicas clásicas y ofreciendo la posibilidad de individualizar las estrategias de tratamiento adyuvante.

7. Nuestros resultados requieren ser confirmados en estudios prospectivos a gran escala, preferentemente en el contexto de ensayos clínicos de tratamiento adyuvante, como paso previo a plantear su aplicabilidad en la práctica clínica.

VIII. APÉNDICE

**1. ARTÍCULOS PUBLICADOS EN REVISTAS INTERNACIONALES
RELACIONADOS CON LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN**

Páginas

Pharmacogenetic predictors of outcome in patients with stage II and III colon cancer treated with oxaliplatin and fluoropyrimidine-based adjuvant chemotherapy. 218-229

Custodio A, Moreno-Rubio J, Aparicio J, Gallego-Plazas J, Yaya R, Maurel J, Rodríguez-Salas N, Burgos E, Ramos D, Calatrava A, Andrada E, Díaz-López E, Sánchez A, Madero R, Cejas P, Feliu J

Mol Cancer Ther 2014; 13 (9):2226-37

Pharmacogenetic predictors of severe peripheral neuropathy in colon cancer patients treated with oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy: a GEMCAD group study 230-235

Custodio A, Moreno-Rubio J, Aparicio J, Gallego-Plazas J, Yaya R, Maurel J, Higuera O, Burgos E, Ramos D, Calatrava A, Andrada E, López R, Moreno V, Madero R, Cejas P, Feliu J

Ann Oncol 2014; 25 (2):398-403

2. CLAVE DE ABREVIATURAS

- ABCB1/MDR1: ATP-binding cassette, subfamily B, member 1/ Multidrug resistance 1
- ABCC1-2/MRP1-2: ATP-binding cassette, subfamily C, member 1-2/ Multidrug resistance-related proteins 1-2
- ABCG2/BRCP: ATP-binding cassette, subfamily G, member 2/ Breast cancer resistance protein
- AJCC: American Joint Committee on Cancer
- AKT1/2: Homólogo 1 del oncogén viral del timoma murino 1/2
- ALT: Alanina aminotransferase
- ANGPT1: Angiopietina-1
- ASCO: American Society of Clinical Oncology
- AST: Aspartato aminotransferasa
- BER: Base excision repair (sistema de reparación del ADN por excisión de bases).
- CAPOX: Oxaliplatino 130 mg/m² día 1+ capecitabina 1000 mg/m²/12 horas durante 14 días en ciclos de 21 días.
- CC: Cáncer de colon
- CCN: Ciclina
- CCR: Cáncer colorectal
- CDA: Citidina desaminasa
- CDK: Ciclina dependiente de quinasa
- CEA: Antígeno carcinoembrionario
- CEIC: Comité ético de investigación clínica
- CES: Carboxilesterasas
- CNVs: Variaciones en el número de copias
- CTR: Proteínas transportadoras de cobre
- CXCR-1: Receptor de quimioquinas-1
- CXCR-2: Receptor de quimioquinas-1
- 5'- dFCR: 5'-deoxi-5-fluorocitidina
- 5'-DFUR: Doxifluridina
- DHFU: Dihidrofluorouracilo
- dMMR: MMR deficiente
- dNTP: Dinucleótidos trifosfato
- DPD: Dihidropirimidina deshidrogenasa
- dTMP: Deoxitimidina-5'-monofosfato
- dTTP: Deoxitimidina trifosfato

- EGF: Factor de crecimiento epidérmico
- EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico
- EHW: Equilibrio de Hardy-Weinberg
- ERCC1: Excision repair cross complementing group 1
- ERCC2/XPD: Excision repair cross complementing group 2/ Xeroderma pigmentosum group D
- ERCC5: Excision repair cross complementing group 5
- ERCC6: Excision repair cross complementing group 6
- ESMO: European Society of Medical Oncology
- FBAL: Fluoro-beta-alanina
- FdUMP: 5-fluoro-2'-dexosiridina monofosfato
- FLOX: Oxaliplatino 85 mg/m² las semanas 1,3 y 5, 5-FU 500 mg/m² semanal, LV 500 mg/m² semanal, en ciclos de 8 semanas
- FOLFIRI: Irinotecán 180 mg/m² día 1, LV 200 mg/m² seguido de 5-FU bolus 400 mg/m² y 5-FU 600 mg/m² en infusión continua de 22 horas los días 1 y 2, cada 14 días
- FOLFOX4: Oxaliplatino 85 mg/m² día 1, LV 200 mg/m² seguido de 5-FU bolus 400 mg/m² y 5-FU 600 mg/m² en infusión continua de 22 horas los días 1 y 2, cada 14 días
- FOLFOX6: Oxaliplatino 85 mg/m² día 1, LV 400 mg/m² día 1, 5-FU bolus 400 mg/m² día 1 y 5-FU 2400 mg/m² en infusión continua de 46 horas, cada 14 días
- 5-FU: 5-fluorouracilo
- FUDR: 5-fluoro-2'-dexosiridina
- FUMP: Fluorouridina monofosfato/ FUDP: Fluorouridina difosfato/ FUTP: Fluorouridina trifosfato
- GST: Glutation-S-transferasa
- GWAS: Genome-wide association studies (estudios de asociación del genoma completo).
- HIF-1 α : Factor inducible por hipoxia-1 α
- hME: Homogenous mass extend
- HR: Hazard ratio
- HRR: Homologous recombination repair (sistema de reparación del ADN por recombinación homóloga)
- IC: Intervalo de confianza
- ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular-1
- IFL: 5-FU bolus 500 mg/m², LV 20 mg/m² e irinotecán 125 mg/m² semanal durante 4 semanas, con 2 semanas de descanso durante un total de 30 semanas
- IGF: Factor de crecimiento insulínico
- IGFBP: Proteína de unión al factor de crecimiento insulínico
- IGF-R: Receptor del factor de crecimiento insulínico
- IL-8: Interleuquina-8
- IL-1 β : Interleuquina-1 β
- IL-1RN: Receptor antagonista de IL-1

- IMS: Inestabilidad de microsatélites
- IMS-H: Alta inestabilidad de microsatélites
- IMS-L: Baja inestabilidad de microsatélites
- iPLEX: Increased Plexing Efficiency and Flexibility
- LCP1: L-plastin
- LEV: Levamisol
- LOH: Pérdida de heterocigosidad
- LSN: Límite superior de la normalidad
- LV: Leucovorín
- LV5FU2: Esquema de de Gramont (LV 200 mg/m² seguido de 5-FU bolus 400 mg/m² y 5-FU 600 mg/m² en infusión continua de 22 horas los días 1 y 2, cada 14 días)
- MALDI-TOF: Espectrometría de masas matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight
- MGMT: Metilguanina metiltransferasa
- MMP: Metaloproteínasa de matriz extracelular
- MMR: Mistmach repair (errores de apareamiento de bases)
- MSS: Microsatélites estables
- MTHFR: 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa
- mTOR: Mechanistic target of rapamycin
- NCCN: National Comprehensive Cancer Network
- NCCTG: North Central Cancer Treatment Group
- NCI-CTGAE: National Cancer Institute- Common Terminology Criteria for Adverse Events
- NER: Nucleotide excision repair (sistema de reparación del ADN por excisión de nucleótidos)
- NSABP: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project
- OCT: Transportador de cationes orgánicos
- OPRT: Orotato fosforibosiltransferasa
- OR: Odds ratio
- PET: Tomografía por emisión de positrones
- P-gp: Glicoproteína P
- PLS3: T-plastin
- QT: Quimioterapia
- RAD 23B: RAD23 homólogo B
- RAG: Ratio de afectación ganglionar
- RM: Resonancia magnética
- RRM: Ribonucleótido reductasa
- RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa reversa

- SAP: Fosfatasa alcalina de renacuajo
- SBE: Single base extension
- SEER: Surveillance, Epidemiology and End Results Program
- SELE: E-selectina
- SG: Supervivencia global
- SLE: Supervivencia libre de enfermedad
- SLP: Supervivencia libre de progresión
- SNP: Single nucleotide polymorphism (polimorfismo de nucleótido único)
- SULT: Sulfotransferasa
- sICAM1: Molécula de adhesión intercelular soluble
- TC: Tomografía computerizada
- TFIIH: Factor de transcripción de iniciación humano II
- TGF- β : Factor de crecimiento transformante- β
- TK: Timidina quinasa
- TP: Timidina fosforilasa
- TS: Timidilato sintetasa
- TSER: Timidilato sintetasa *enhancer region*
- UICC: International Union Against Cancer
- UMPS: Uridina monofosfato sintetasa
- UPP: Uridina fosforilasa
- 3' - UTR: Región no traducida 3' / 5' - UTR: Región no traducida 5'
- VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular
- VEGFR: Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular
- VNTR: Número variable de repeticiones en tándem
- WT: Wild type
- XPA: Xeroderma pigmentosum group A
- XPB: Xeroderma pigmentosum group B
- XPC: Xeroderma pigmentosum group C
- XPF: Xeroderma pigmentosum group F
- XPG: Xeroderma pigmentosum group G
- XRCC1: X-ray repair cross-complementing group 1
- XRCC2: X-ray repair cross-complementing group 2
- XRCC3: X-ray repair cross-complementing group 1

3. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Definiciones TNM (AJCC/UICC 2010).....	16
Tabla 2: Clasificación por estadios/grupos pronóstico (AJCC/UICC 2010).....	17
Tabla 3: Principales ensayos de QT adyuvante con fluoropirimidinas.....	22
Tabla 4: Ensayos clínicos de QT adyuvante basada en oxaliplatino.....	25
Tabla 5: Ensayos clínicos de QT adyuvante basada en irinotecán.....	26
Tabla 6: Ensayos clínicos de QT adyuvante con terapias dirigidas.....	27
Tabla 7: Supervivencia a los 5 años en 28.491 pacientes con adenocarcinoma de colon (SEER 1973-2005).....	33
Tabla 8: Categorías de enfermedad residual en la clasificación TNM 2010.....	36
Tabla 9: Clasificación histológica de CCR de la Organización Mundial de la Salud.....	37
Tabla 10: Estudios que analizan el valor pronóstico/predictivo de la IMS en pacientes tratados con QT adyuvante basada en 5-FU.....	44
Tabla 11: Estudios que analizan el valor pronóstico/predictivo de la IMS en pacientes tratados con QT adyuvante basada en oxaliplatino e irinotecán.....	45
Tabla 12: Perfiles de expresión génica.....	50
Tabla 13: Efectos de los polimorfismos en la estructura y función proteica.....	53
Tabla 14: Polimorfismos comunes en la farmacología de las fluoropirimidinas y su repercusión funcional.....	57
Tabla 15: Estudios farmacogenómicos de TS en el tratamiento adyuvante del CCR.....	60
Tabla 16: Principales estudios farmacogenómicos de DPD en relación con la toxicidad por fluoropirimidinas en CCR.....	63
Tabla 17: Principales estudios farmacogenómicos de MTHFR en pacientes con CCR tratados con QT adyuvante.....	66
Tabla 18: Polimorfismos comunes en sistemas enzimáticos implicados en la farmacología del oxaliplatino.....	70
Tabla 19: Principales estudios farmacogenómicos de polimorfismos en genes implicados en los sistemas de reparación del ADN y detoxificación de GSTs en pacientes con CCR tratados con QT adyuvante basada en oxaliplatino.....	77
Tabla 20: Principales estudios farmacogenómicos de polimorfismos en genes implicados en la vía de señalización de EGFR.....	80

Tabla 21: Principales estudios farmacogenómicos de polimorfismos en genes implicados en la angiogénesis en pacientes con CCR tratados con QT adyuvante.....	83
Tabla 22: Polimorfismos comunes en genes de la superfamilia de los transportadores ABC.....	86
Tabla 23: Principales estudios farmacogenómicos de polimorfismos en genes de la superfamilia de transportadores ABC.....	87
Tabla 24: Criterios de inclusión.....	100
Tabla 25: Criterios de exclusión.....	101
Tabla 26: Descripción de los polimorfismos incluidos en el estudio.....	105
Tabla 27: Polimorfismos incluidos en el análisis de toxicidad.....	109
Tabla 28: Compuestos de la reacción de PCR.....	116
Tabla 29: Compuestos de la reacción iPLEX.....	118
Tabla 30: Características clínico-patológicas de las cohortes de diseño y de validación.....	126
Tabla 31: Esquema de QT en cada cohorte en función del estadio.....	128
Tabla 32: Frecuencias genotípicas de los polimorfismos estudiados.....	129
Tabla 33: Asociación de las variables clínico-patológicas y terapéuticas con la SLE en la cohorte de diseño.....	139
Tabla 34: Asociación de las variables clínico-patológicas y terapéuticas con la SG en la cohorte de diseño.....	140
Tabla 35: Asociación de las variables clínico-patológicas y terapéuticas con la SLE en la cohorte de validación.....	141
Tabla 36: Asociación de las variables clínico-patológicas y terapéuticas con la SG en la cohorte de validación.....	142
Tabla 37: Análisis uni y multivariante de la asociación entre el SNP SELE rs3917412 G>A y la SLE en la cohorte de diseño.....	143
Tabla 38: Análisis uni y multivariante de la asociación entre el MTHFR rs1801133 C>T y la SLE en la cohorte de diseño.....	145
Tabla 39: Análisis uni y multivariante de la asociación entre la SLE y la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en la cohorte de diseño.....	147
Tabla 40: Análisis uni y multivariante de la asociación entre la SLE y la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en la cohorte de validación.....	149
Tabla 41: Análisis uni y multivariante de la asociación entre la SG y la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en la cohorte de diseño.....	15

Tabla 42: Análisis uni y multivariante de la asociación entre la SG y la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en la cohorte de validación.....	155
Tabla 43: Distribución alélica de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en función del estadio en la cohorte de diseño y validación.....	157
Tabla 44: Distribución alélica de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en función del sexo en la cohorte de diseño y validación.....	158
Tabla 45: Análisis de la asociación entre la SLE y la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en los pacientes con estadio III.....	161
Tabla 46: Análisis uni y multivariante de la asociación entre la SLE y la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en mujeres.....	166
Tabla 47: Incidencia de eventos adversos en cada cohorte.....	171
Tabla 48: Análisis uni y multivariante de la asociación entre el SNP XRCC2 rs3218408 T>G y la toxicidad grado 3-4 en la cohorte de diseño.....	173
Tabla 49: Análisis uni y multivariante de la asociación entre el SNP MTHFR rs1801133 C>T y la toxicidad grado 3-4 en la cohorte de diseño.....	175
Tabla 50: Análisis uni y multivariante de la asociación entre los SNP XRCC2 rs3218408 T>G y MTHFR rs1801133 C>T y la toxicidad grado 3-4 en la cohorte de diseño.....	176
Tabla 51: Análisis uni y multivariante de la asociación entre los SNP XRCC2 rs3218408 T>G y MTHFR rs1801133 C>T y la toxicidad grado 3-4 en la cohorte de validación.....	178
Tabla 52: Factores pronóstico y supervivencia en pacientes tratados con oxaliplatino en nuestra serie y en ensayos fase III.....	191
Tabla 53: Máximo grado de toxicidad en pacientes tratados con oxaliplatino en nuestra serie y en ensayos fase III.....	192
Tabla 54: Estudios farmacogenómicos en CC estadio II-III tratados con QT adyuvante basada en oxaliplatino y fluoropirimidinas.....	196
Tabla 55: Estudios farmacogenómicos en CC con análisis estratificado en función del sexo y del estadio.....	205

4. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Vías metabólicas de los compuestos fluoropirimidínicos.....	56
Figura 2: Vías metabólicas del oxaliplatino.....	69
Figura 3: Diagrama de flujo de la selección de pacientes incluídos en el estudio en las cohortes de diseño (3A) y de validación (3B).....	102
Figura 4: Esquemas de QT adyuvante utilizados.....	103
Figura 5: Esquemas de la tecnología iPLEX® Gold MassARRAY (Sequenom).....	115
Figura 6: Etapas de la reacción de PCR.....	117
Figura 7: Espectro de masas obtenido mediante espectrometría MALDI-TOF.....	120
Figura 8: Análisis de genotipos (software MassARRAY Workstation versión 3.4).....	120
Figura 9: Esquema de QT adyuvante en las dos cohortes.....	127
Figura 10: SLE en las cohortes de diseño y de validación.....	137
Figura 11: SG en las cohortes de diseño y de validación.....	138
Figura 12: SLE en función del SNP SELE rs3917412 G>A en la cohorte de diseño.....	144
Figura 13: SLE en función del SNP MTHFR rs1801133 C>T en la cohorte de diseño....	146
Figura 14: SLE en función de la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en la cohorte de diseño.....	148
Figura 15: SLE en función de la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en la cohorte de validación.....	150
Figura 16: SG en función del SNP SELE rs3917412 G>A en la cohorte de diseño.....	151
Figura 17: SG en función del SNP MTHFR rs1801133 C>T en la cohorte de diseño....	152
Figura 18: SG en función de la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en la cohorte de diseño.....	154
Figura 19: SG en función de la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en la cohorte de validación.....	156
Figura 20: SLE en función de la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en pacientes con estadio III (cohorte de diseño).....	159
Figura 21: SLE en función de la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en pacientes con estadio III (cohorte de validación).....	160

Figura 22: SG en función de la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en pacientes con estadio III (cohorte de diseño).....	162
Figura 23: SG en función de la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en pacientes con estadio III (cohorte de validación).....	163
Figura 24: SLE en función de la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en mujeres (cohorte de diseño).....	164
Figura 25: SLE en función de la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en mujeres (cohorte de validación).....	165
Figura 26: SG en función de la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en mujeres (cohorte de diseño).....	167
Figura 27: SG en función de la combinación de los SNP SELE rs3917412 G>A y MTHFR rs1801133 C>T en mujeres (cohorte de validación).....	168
Figura 28: Toxicidad global en la cohorte de diseño y de validación.....	169
Figura 29: Toxicidad grado 3-4 en función del SNP XRCC2 rs3218408 T>G en la cohorte de diseño.....	174
Figura 30: Toxicidad grado 3-4 en función del SNP MTHFR rs1801133 C>T en la cohorte de diseño.....	175
Figura 31: Toxicidad grado 3-4 en función de la combinación de los SNP XRCC2 rs3218408 T>G y MTHFR rs1801133 C>T en la cohorte de diseño.....	177
Figura 32: Toxicidad grado 3-4 en función de la combinación de los SNP XRCC2 rs3218408 T>G y MTHFR rs1801133 C>T en la cohorte de validación.....	178
Figura 33: Principales pasos en el diseño de estudios farmacogenómicos.....	182
Figura 34: Estructura de la SELE.....	197
Figura 35: Paradigma de estudio farmacogenómico e implementación clínica.....	210

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014; 64(1):765-81.
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127(12): 2893-2917.
3. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015 [Epub ahead of print].
4. Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014; 64(2):104-17.
5. Ferlay J, Parkin DM, Steliano-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 2010; 46(4): 765-81.
6. Bossetti C, Levi F, Rosato V, Bertuccio P, Lucchini F, Negri E, et al. Recent trends in colorectal cancer mortality in Europe. *Int J Cancer* 2011; 129(1):180-91.
7. Wolmark N, Rockette H, Fisher B, Wickerham DL, Redmond C, Fisher ER, et al. The benefit of leucovorin-modulated fluorouracil as postoperative adjuvant therapy for primary colon cancer: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocol C-03. *J Clin Oncol* 1993; 11(10):1879-87.
8. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators. *Lancet* 1995; 345(8955):939-44.
9. O'Connell MJ, Mailliard JA, Kahn MJ, Macdonald JS, Haller DG, Mayer RJ, et al. Controlled trial of fluorouracil and low-dose leucovorin given for 6 months as postoperative adjuvant therapy for colon cancer. *J Clin Oncol* 1997; 15(1): 246-50.
10. André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 2004; 350(23): 2343-51.
11. Kuebler JP, Wieand HS, O'Connell MJ, Smith RE, Colangelo LH, Yothers G, et al. Oxaliplatin combined with weekly bolus fluorouracil and leucovorin as surgical adjuvant chemotherapy for stage II and III colon cancer: results from the NSABP C-07. *J Clin Oncol* 2007; 25(16): 2198-74.
12. Schmoll HJ, Cartwright T, Tabernero J, Nowacki MP, Figer A, Maroun J, et al. Phase III trial of capecitabine plus oxaliplatin as adjuvant therapy for stage III colon cancer: a planned safety analysis in 1864 patients. *J Clin Oncol* 2007; 25(1): 102-9.
13. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, Mosconi S, Mandalà M, Cervantes A, et al. Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2013; 24 suppl 6:vi64-72.
14. Benson AB 3rd, Schrag D, Somerfield MR, Cohen AM, Figueredo AT, Flynn PJ, et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22(16): 3408-19.
15. Petersen VC, Baxter KJ, Love SB, Shepherd NA. Identification of objective pathological prognostic determinants and models of prognosis in Dukes' B colon cancer. *Gut* 2002; 51(1): 65-9.
16. Shepherd NA, Baxter KJ, Love SB. The prognostic importance of peritoneal involvement in colonic cancer: a prospective evaluation. *Gastroenterology* 1997; 112(4): 1096-102.
17. Berger AC, Sigurdson ER, LeVoyer T, Hanlon A, Mayer RJ, Macdonald JS, et al. Colon cancer survival is associated with decreasing ratio of metastatic to examined lymph nodes. *J Clin Oncol* 2005; 23(34): 8706-12.
18. Chen SL, Bilchik AJ. More extensive nodal dissection improves survival for stage I to III of colon cancer: a population-based study. *Ann Surg* 2006; 244(4): 602-10.
19. Rahbari NN, Bork U, Motschall E, Thorlund K, Büchler MW, Koch M, et al. Molecular detection of tumor cells in regional lymph nodes is associated with disease recurrence and poor survival in node-negative colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 2012; 30(1): 60-70.
20. Sloothaak DA, Sahami S, van der Zaag-Loonen HJ, van der Zaag ES, Tanis PJ, Bemelman WA. The prognostic value of micrometastases and isolated tumour cells in histologically negative lymph nodes of patients with colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Surg Oncol* 2014; 40(3):263-69.
21. Betge J, Pollheimer MJ, Lindtner RA, Kornprat P, Schlemmer A, Rehak P, et al. Intramural and extravascular invasion in colorectal cancer: prognostic significance and quality of pathology reporting. *Cancer* 2012; 118(3): 628-38.
22. Liebig C, Ayala G, Wilks J, Verstovsek G, Liu H, Agarwal N, et al. Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(31): 5131-37.
23. Huh JW, Kim HR, Kim YJ. Prognostic value of perineural invasion in patients with stage II colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2010; 17(8): 2066-72.
24. Quah HM, Chou JF, Gonen M, Shia J, Schrag D, Landmann RG, et al. Identification of patients with high-risk stage II colon cancer for adjuvant therapy. *Dis Colon Rectum* 2008; 51(5): 503-07.
25. Takagawa R, Fujii S, Ohta M, Nagano Y, Kunisaki C, Yamagishi S, et al. Preoperative serum carcinoembryonic antigen level as a predictive factor of recurrence resection of colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2008; 15 (12): 3433-39.
26. Lin HH, Chang YY, Lin JK, Jiang JK, Lin CC, Lan YT, et al. The role of adjuvant chemotherapy in stage II colorectal cancer patients. *Int J Colorectal Dis* 2014; 29(10):1237-43.
27. Jessup JM, Stewart AK, Menck HR. The National Cancer Data Base report on patterns of care for adenocarcinoma of the rectum, 1985-95. *Cancer* 1998; 83(11):2408-18.
28. Chang GJ, Rodriguez-Bigas MA, Skibber JM, Moyer VA. Lymph node evaluation and survival after curative resection of colon cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99(6): 433-41.

29. Le Voyer TE, Sigurdson ER, Hanlon AL, Mayer RJ, Macdonald JS, Catalano PJ, et al. Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: A secondary survey of Intergroup trial INT-0089. *J Clin Oncol* 2003; 21(15):2912-19.
30. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005; 23(3):609-18.
31. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28(20):3219-26.
32. Hutchins G, Southward K, Handley K, Magill L, Beaumont C, Stahlschmidt J, et al. Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29(10):1261-70.
33. Popat S, Zhao D, Chen Z, Pan H, Shao Y, Chandler I, et al. Relationship between chromosome 18q status and colorectal cancer prognosis: a prospective, blinded analysis of 280 patients. *Anticancer Res* 2007; 27(1B):627-33.
34. Belt ET, Brosens RP, Delis-van Diemen PM, Bril H, Tijssen M, van Essen DF, et al. Cell cycle proteins predict recurrence in stage II and III colon cancer. *Ann Surg Oncol* 2012; 19 (suppl 3): S682-92.
35. Salazar R, Roepman P, Capella G, Moreno V, Simon I, Dreezen C, et al. Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29(1):17-24.
36. Soong R, Diasio RB. Advances and challenges in fluoropyrimidine pharmacogenomics and pharmacogenetics. *Pharmacogenomics* 2005; 6(8): 835-47.
37. Cortejoso L, López-Fernández LA. Pharmacogenetic markers of toxicity for chemotherapy in colorectal cancer patients. *Pharmacogenomics* 2012; 1(10): 1173-91.
38. Amstutz U, Farese S, Aebi S, Largiadèr CR. Dihydropyrimidine dehydrogenase gene variation and severe 5-fluorouracil toxicity: a haplotype assessment. *Pharmacogenomics* 2009; 10(6):931-44.
39. De Mattia E, Toffoli G. C677T and A1298C MTHFR polymorphisms, a challenge for antifolate and fluoropyrimidine-based therapy personalization. *Eur J Cancer* 2009; 45(8):1333-51.
40. Lurje G, Zhang W, Yang D, Groshen S, Hendifar AE, Husain H, et al. Thymidylate synthase haplotype is associated with tumour recurrence in stage II and III colon cancer. *Pharmacogenet Genomics* 2008; 18(2): 161-68.
41. Cecchin E, D'Andrea M, Lonardi S, Zanusso C, Pella N, Errante D, et al. A prospective validation pharmacogenomic study in the adjuvant setting of colorectal cancer patients treated with the 5-fluorouracil/leucovorin/oxaliplatin (FOLFOX4) regimen. *Pharmacogenomics J* 2013; 13(5):403-09.
42. Popat S, Matakidou A, Houlston RS. Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 2004; 22(3):529-36.
43. Jensen SA, Vainer B, Sorensen JB. The prognostic significance of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in colorectal cancer of 303 patients adjuvantly treated with 5-fluorouracil. *Int J Cancer* 2007; 120(3):694-701.
44. Zaanen A, Dalban C, Emile JF, Blons H, Fléjou JF, Goumard C, et al. ERCC1, XRCC1 and GSTP1 single nucleotide polymorphisms and survival of patients with colon cancer receiving oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy. *J Cancer* 2014; 5(6):425-32.
45. Fariña-Sarasqueta A, van Lijnschoten G, Lemmens VE, Rutten HJ, van den Brule AJ. Pharmacogenetics of oxaliplatin as adjuvant treatment in colon carcinoma: are single nucleotide polymorphisms in GSTP1, ERCC1, and ERCC2 good predictive markers? *Mol Diagn Ther* 2011; 15(5):277-83.
46. Páez D, Gerger A, Zhang W, Yang D, Labonte MJ, Benhanim L, et al. Association of common gene variants in the WNT/ β -catenin pathway with colon cancer recurrence. *Pharmacogenomics J* 2014; 14(2):142-50.
47. Benhaim L, Gerger A, Bohanes P, Paez D, Wakatsuki T, Yang D, et al. Gender-specific profiling in SCN1A polymorphisms and time-to-recurrence in patients with stage II/III colorectal cancer treated with adjuvant 5-fluorouracil chemotherapy. *Pharmacogenomics J* 2014; 14(2):135-41.
48. Ning Y, Gerger A, Zhang W, Hanna DL, Yang D, Winder T, et al. Platin polymorphisms predict gender- and stage-specific colon cancer recurrence after adjuvant chemotherapy. *Mol Cancer Ther* 2014; 13(2):528-39.
49. Johnson RC, Nelson GW, Troyer JL, Lautenberger JA, Kessing BD, Winkler CA, et al. Accounting for multiple comparisons in a genome-wide association study (GWAS). *BMC Genomics* 2010; 11:724.
50. Chang HW, Chuang LY, Tsai MT, Yang CH. The importance of integrating SNP and cheminformatics resources to pharmacogenomics. *Curr Drug Metab* 2012; 13(7):991-99.
51. López-Abente G, Ardanaz E, Torrella-Ramos A, Mateos A, Delgado-Sanz C, Chirlaque MD; Colorectal Cancer Working Group. Changes in colorectal cancer incidence and mortality trends in Spain. *Ann Oncol* 2010; 21 (suppl 3):iii76-iii82.
52. Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin* 2009; 59 (6): 366-78.
53. Schoen RE, Pinsky PF, Weissfeld JL, Yokochi LA, Church T, Laiyemo AO, et al. Colorectal-cancer incidence and mortality with screening flexible sigmoidoscopy. *N Engl J Med* 2012; 366(25): 2345-57.
54. Nishihara R, Wu K, Lochhead P, Morikawa T, Liao X, Qian ZR, et al. Long-term colorectal-cancer incidence and mortality after lower endoscopy. *N Engl J Med* 2013; 369(12): 1095-105.
55. Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2014. *Ann Oncol* 2014; 25(8):1650-56.

56. Lee BY, Sonnenberg A. Time trends of mortality from colorectal cancer in the United States: a birth-cohort analysis. *JAMA Intern Med* 2013; 73(12):1148-50.
57. Lohsiriwat V, Thavichaigarn P, Awapittaya B. A multicenter prospective study of immunochemical fecal occult blood testing for colorectal cancer detection. *J Med Assoc Thai* 2007; 90(11):2291-95.
58. Pickhardt PJ, Hassan C, Halligan S, Marmo R. Colorectal cancer: CT colonography and colonoscopy for detection-systematic review and meta-analysis. *Radiology* 2011; 259(2):393-405.
59. Atkin W, Dadswell E, Wooldrage K, Kralj-Hans I, von Wagner C, Edwards R. Computed tomographic colonography versus colonoscopy for investigation of patients with symptoms suggestive of colorectal cancer (SIGGAR): a multicenter randomized trial. *Lancet* 2013; 381(9873):1194-202.
60. Samadder NJ, Curtin K, Tuohy TM, Pappas L, Boucher K, Provenzale D. Characteristics of missed or interval colorectal cancer and patient survival: a population-based study. *Gastroenterology* 2014; 146(4):950-60.
61. Halligan S, Wooldrage K, Dadswell E, Kralj-Hans I, von Wagner C, Edwards R, et al. Computed tomographic colonography versus barium enema for diagnosis of colorectal cancer or large polyps in symptomatic patients (SIGGAR): a multicenter randomised trial. *Lancet* 2013; 381(9873):1185-93.
62. Pullens HJ, van Leeuwen MS, Laheij RJ, Vleggaar FP, Siersema PD. CT-colonography after incomplete colonoscopy: what is the diagnostic yield? *Dis Colon Rectum* 2013; 56(5):593-99.
63. Palmqvist R, Engaras B, Lindmark G, Hallmans G, Tavelin B, Nilsson O, et al. Prediagnostic levels of carcinoembryonic antigen and CA 242 in colorectal cancer: a matched case-control study. *Dis Colon Rectum* 2003; 46(11):1538-44.
64. Thirunavukarasu P, Sukumar S, Sathaiyah M, Mahan M, Pragatheeshwar KD, Pingpank JF, et al. C-stage in colon cancer: implications of carcinoembryonic antigen biomarker in staging, prognosis and management. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103(8):689-97.
65. Park JJ, Choi GS, Lim KH, Kang BM, Jun SH. Serum carcinoembryonic antigen monitoring after curative resection for colorectal cancer: clinical significance of the preoperative level. *Ann Surg Oncol* 2009; 16(11): 3087-93.
66. Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24 (33): 5313-27.
67. Duffy MJ, Lamerz R, Haglund C, Nicolini A, Kalousova M, Holubec L, et al. Tumor markers in colorectal cancer, gastric cancer and gastrointestinal stromal cancers: European group on tumor markers 2014 guidelines update. *Int J Cancer* 2014; 134(11):2513-22.
68. Tskitis VL, Malireddy K, Green EA, Christensen B, Whelan R, Hyder J, et al. Postoperative surveillance recommendations for early stage colon cancer based on results from the clinical outcomes of surgical therapy trial. *J Clin Oncol* 2009; 27(22): 3671-76.
69. Restivo A, Zorcolo L, Piga S, Cocco IM, Casula G. Routine preoperative chest computed tomography does not influence therapeutic strategy in patients with colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2012; 14(5): e216-21.
70. Hogan J, O'Rourke C, Duff G, Burton M, Kelly N, Burke J, et al. Preoperative staging CT thorax in patients with colorectal cancer: its clinical importance. *Dis Colon Rectum* 2014; 57 (11):1260-66.
71. Nordholm-Carstensen A, Wille-Jørgensen PA, Jørgensen LN, Harling H. Indeterminate pulmonary nodules at colorectal cancer staging: a systematic review of predictive parameters for malignancy. *Ann Surg Oncol* 2013; 20(12):4022-30.
72. Mauchley DC, Lynge DC, Langdale LA, Stelzner M. Clinical utility and cost-effectiveness of routine preoperative computed tomography scanning in patients with colon cancer. *Am J Surg* 2005; 189(5): 512-17.
73. Tudyka V, Blomqvist L, Beets-Tan RG, Boelens PG, Valentini V, van de Velde CJ. EURECCA consensus conference highlights about colon & rectal cancer multidisciplinary management: the radiology experts review. *Eur J Surg Oncol* 2014; 40(4):469-75.
74. Niekel MC, Bipat S, Stoker J. Diagnostic imaging of colorectal liver metastases with CT, MR imaging, FDG PET, and/or FDG PET/CT: a meta-analysis of prospective studies including patients who have not previously undergone treatment. *Radiology* 2010; 257(3):674-84.
75. Koh JL, Yan TD, Glenn D, Morris DL. Evaluation of preoperative computed tomography in estimating peritoneal cancer index in colorectal peritoneal carcinomatosis. *Ann Surg Oncol* 2009; 16(2): 327-33.
76. Esquivel J, Chua TC, Stojadinovic A, Melero JT, Levine EA, Gutman M, et al. Accuracy and clinical relevance of computed tomography scan interpretation of peritoneal cancer index in colorectal cancer peritoneal carcinomatosis: a multi-institutional study. *J Surg Oncol* 2010; 102(6): 565-70.
77. Bonanni L, De'liguori Carino N, Deshpande R, Ammori BJ, Sherlock DJ, Valle JW, et al. A comparison of diagnostic imaging modalities for colorectal liver metastases. *Eur J Surg Oncol* 2014; 40(5):545-50.
78. Akiyoshi T, Oya M, Fujimoto Y, Kuroyanagi H, Ueno M, Yamaguchi T, et al. Comparison of preoperative whole-body positron emission tomography with MDCT in patients with primary colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2009; 11(5):464-69.
79. Brush J, Boyd K, Chappell F, Crawford F, Dozier M, Fenwick E, et al. The value of FDG positron emission tomography/computerised tomography (PET/CT) in preoperative staging of colorectal cancer: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* 2011; 15(35): 1-192, iii-iv.
80. Ozkan E, Sovdal C, Araz M, Kir KM, Ibis E. The role of 18F-FDG PET/CT in detecting colorectal cancer recurrence in patients with elevated CEA levels. *Nucl Med Commun* 2012; 33(4):395-40.

81. Ruers TJ, Wiering B, van der Sijp JR, Roumen RM, de Jong KP, Comans EF, et al. Improved selection of patients for hepatic surgery of colorectal liver metastases with 18(F)-FDG PET: a randomized study. *J Nucl Med* 2009; 50(7): 1036-41.
82. Glazer ES, Beaty K, Abdalla EK, Vauthey JN, Curley SA. Effectiveness of positron emission tomography for predicting chemotherapy response in colorectal cancer liver metastases. *Arch Surg* 2010; 145(4): 340-45.
83. Hariharan D, Constantinides V, Kocher HM, Tekkis PP. The role of laparoscopy and laparoscopy ultrasound in the preoperative staging. *Am J Surg* 2012; 204(1): 84-92.
84. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. *AJCC Cancer Staging Manual* (ed 7th Edition). New York: Springer; 2010.
85. Washington MK, Berlin J, Branton P, Burgart LJ, Carter DK, Fitzgibbons PL. Members of the Cancer Committee, College of American Pathologists. Protocol for the examination of specimens from patients with primary carcinoma of the colon and rectum. *Arch Pathol Lab Med* 2009; 133(10):1539-51.
86. Gunderson LL, Jessup JM, Sargent DJ, Greene FL, Stewart A. Revised TN categorization for colon cancer based on national survival outcomes data. *J Clin Oncol* 2010; 28(2):264-71.
87. Chin CC, Wang JY, Yeh CY, Kuo YH, Huang WS, Yeh CH. Metastatic lymph node ratio is a more precise predictor of prognosis than number of lymph node metastases in stage III colon cancer. *Int J Colorectal Dis* 2009; 24(11): 1297-302.
88. West NP, Kobayashi H, Takahashi K, Perrakis A, Weber K, Hohenberger W, et al. Understanding optimal colonic cancer surgery: comparison of Japanese D3 resection and European complete mesocolic excision with central vascular ligation. *J Clin Oncol* 2012; 30(15):1763-69.
89. Sawai RS. Management of colonic obstruction: a review. *Clin Colon Rectal Surg* 2012; 25(4): 200-03.
90. Engledow Ah, Bond-Smith G, Motson RW, Jenkinson A. Treatment of left-sided colonic emergencies: a comparison of US and UK surgical practices. *Colorectal Dis* 2009; 11(6):642-7.
91. Green BL, Marshall HC, Collinson F, Quirke P, Guillou P, Jayne DG, et al. Long-term follow-up of the Medical Research Council CLASICC trial of conventional versus laparoscopically assisted resection in colorectal cancer. *Br J Surg* 2013; 100(1):75-82.
92. Stucky CC, Pockai BA, Novotny PJ, Sloan JA, Sargent DJ, O'Connell M, et al. Long-term follow-up and individual item analysis of quality of life assessments related to laparoscopic-assisted colectomy in the COST trial 93-46-53 (INT 0146). *Ann Surg Oncol* 2011; 18(9):2422-31.
93. Rondelli F, Trastulli S, Avenia N, Schillaci G, Ciocchi R, Gullà N, et al. Is laparoscopic right colectomy more effective than open resection? A meta-analysis of randomized and nonrandomized studies. *Colorectal Dis* 2012; 14(8):e447-69.
94. Di B, Li Y, Wei K, Xiao X, Shi J, Zhang Y, et al. Laparoscopic versus open surgery for colon cancer: a meta-analysis of 5-year follow-up outcomes. *Surg Oncol* 2013; 22(3):e39-43.
95. Colon Cancer Laparoscopic or Open Resection Study Group, Buunen M, Veldkamp R, Hop WC, Hop WC, Kuhry E, Jeekel J, et al. Survival after laparoscopic surgery versus open surgery for colon cancer: long-term outcome of a randomised clinical trial. *Lancet Oncology* 2009; 10(1):44-52.
96. Lacy AM, Delgado S, Castells A, Prins HA, Arroyo V, Ibarzabal A, et al. The long-term results of a randomized clinical trial of laparoscopy-assisted versus open surgery for colon cancer. *Ann Surg* 2008; 248(1):1- 7.
97. André T, Boni C, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol* 2009; 27(19):3109-16.
98. Allegra CJ, Yothers G, O'Connell MJ, Sharif S, Petrelli NJ, Colangelo LH, et al. Phase III trial assessing bevacizumab in stages II and III carcinoma of the colon: results of NSABP protocol C-08. *J Clin Oncol* 2011; 29(1):11-16.
99. De Gramont A, Van Cutsem E, Schmoll HJ, Tabernero J, Clarke S, Moore MJ, et al. Bevacizumab plus oxaliplatin-based chemotherapy as adjuvant treatment for colon cancer (AVANT): a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2012; 13(12):1225-33.
100. Alberts SR, Sargent DJ, Nair S, Mahoney MR, Mooney M, Thibodeau SN, et al. Effect of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab on survival among patients with resected stage III colon cancer: a randomized trial. *JAMA* 2012; 307(13):1383-93.
101. Taieb J, Tabernero J, Mini E, Subtil F, Folprecht G, Van Laethem JL, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab in patients with resected stage III colon cancer (PETACC-8): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014;15(8):862-73.
102. Laurie JA, Moertel CG, Fleming TR, Wieand HS, Leigh JE, Rubin J, et al. Surgical adjuvant therapy of large-bowel carcinoma: an evaluation of levamisole and the combination of levamisole and fluorouracil. The North Central Cancer Treatment Group and the Mayo Clinic. *J Clin Oncol* 1989; 7(10):1447-56.
103. Moertel CG, Fleming TR, McDonald JS, Haller DG, Laurie JA, Goodman PJ, et al. Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy for resected colon carcinoma. *N Engl J Med* 1990; 322(6): 252-58.
104. NIH Consensus Conference. Adjuvant therapy for patients with colon and rectal cancer. *JAMA* 1990; 264(11): 1444-50.
105. Wolmark N, Rockette H, Mamounas E, Jones J, Wieand S, Wickerham DL, et al. Clinical trial to assess the relative efficacy of fluorouracil and leucovorin, fluorouracil and levamisole, and fluorouracil, leucovorin, and

- levamisole in patients with Dukes' B and C carcinoma of the colon: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project C-04. *J Clin Oncol* 1999; 17(11):3553-59.
106. O'Connell MJ, Laurie JA, Kahn M, Fitzgibbons RJ Jr, Erlichman C, Shepherd L, et al. Prospectively randomized trial of postoperative adjuvant chemotherapy in patients with high-risk colon cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16(1):295-300.
 107. Haller DG, Catalano PJ, Macdonald JS, O'Rourke MA, Frontiera MS, Jackson DV, et al. Phase III study of fluorouracil, leucovorin, and levamisole in high-risk stage II and III colon cancer: final report of Intergroup 0089. *J Clin Oncol* 2005; 23(34):8671-78.
 108. Comparison of fluorouracil with additional levamisole, higher-dose folinic acid, or both, as adjuvant chemotherapy for colorectal cancer: a randomised trial. QUASAR Collaborative Group. *Lancet* 2000; 355(9215): 1588-96.
 109. Dencausse Y, Hartung G, Sturm J, Kopp-Schneider A, Hagmüller E, Wojatschek C, et al. Adjuvant chemotherapy in stage III colon cancer with 5-fluorouracil and levamisole versus 5-fluorouracil and leucovorin. *Onkologie* 2002; 25(5):426-30.
 110. Des Guetz G, Uzzan B, Morere JF, Perret G, Nicolas P. Duration of adjuvant chemotherapy for patients with non-metastatic colorectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; 20(1):CD007046.
 111. André T, Colin P, Louvet C, Gamelin E, Bouche O, Achille E, et al. Semimonthly versus monthly regimen of fluorouracil and leucovorin administered for 24 or 36 weeks as adjuvant therapy in stage II and III colon cancer: results of a randomized trial. *J Clin Oncol* 2003; 21(15):2896-903.
 112. André T, Quinaux E, Louvet C, Colin P, Gamelin E, Bouche O, et al. Phase III study comparing a semimonthly with a monthly regimen of fluorouracil and leucovorin as adjuvant treatment for stage II and III colon cancer patients: final results of GERCOR C96.1. *J Clin Oncol* 2007; 25(24):3732-38.
 113. Poplin EA, Benedetti JK, Estes NC, Haller DG, Mayer RJ, Goldberg RM, et al. Phase III Southwest Oncology Group 9415/Intergroup 0153 randomized trial of fluorouracil, leucovorin, and levamisole versus fluorouracil continuous infusion and levamisole for adjuvant treatment of stage III and high-risk stage II colon cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(9):1819-25.
 114. Köhne CH, Bedenne L, Carrato A, Bouché O, Popov I, Gaspà L, et al. A randomised phase III intergroup trial comparing high-dose infusional 5-fluorouracil with or without folinic acid with standard bolus 5-fluorouracil/folinic acid in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: the Pan-European Trial in Adjuvant Colon Cancer 2 study. *Eur J Cancer* 2013; 49(8):1868-75.
 115. Chau I, Norman R, Cunningham D, Tait D, Ross PV, Iveson T, et al. A randomized comparison between 6 months of bolus fluorouracil/leucovorin and 12 weeks of protracted venous infusion fluorouracil as adjuvant treatment in colorectal cancer. *Ann Oncol* 2005; 16(4):549-57.
 116. Sakamoto J, Ohashi Y, Hamada C, Buyse M, Burzykowski P, Piedbois P; Meta-analysis group of the Japanese society for cancer of the colon and rectum; Meta-analysis group in cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22 (3): 484-92.
 117. Twelves C, Wong A, Nowacki MP, Abt M, Burris H 3rd, Carrato A, et al. Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *N Engl J Med* 2005; 352(26):2696-704.
 118. Twelves C, Scheithauer W, McKendrick J, Seitz JF, Van Hazel G, Wong A, et al. Capecitabine versus 5-fluorouracil/folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer: final results from the X-ACT trial with analysis by age and preliminary evidence of a pharmacodynamic marker of efficacy. *Ann Oncol* 2012; 23(5):1190-97.
 119. Lembersky BC, Wieand HS, Petrelli NJ, O'Connell MJ, Colangelo LH, Smith RE, et al. Oral uracil and tegafur plus leucovorin compared with fluorouracil and leucovorin in stage II and III carcinoma of the colon: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol C-06. *J Clin Oncol* 2006; 24(13):2059-64.
 120. Kopec JA, Yothers G, Ganz PA, Land SR, Cecchini RS, Wieand HS, et al. Quality of life in operable colon cancer patients receiving oral compared with intravenous chemotherapy: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Trial C-06. *J Clin Oncol* 2007; 24(4):424-30.
 121. Yothers G, O'Connell MJ, Allegra CJ, Kuebler JP, Colangelo LH, Petrelli NJ, et al. Oxaliplatin as adjuvant therapy for colon cancer: updated results of the NSABP C-07 trial, including survival and subset analysis. *J Clin Oncol* 2011; 29(28):3768-74.
 122. Haller DG, Tabernero J, Maroun J, de Braud F, Price T, Van Cutsem E, et al. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29(11): 1465-71.
 123. Sanoff HK, Carpenter WR, Martin CF, Sargent DJ, Meyerhardt JA, Stürmer T, et al. Comparative effectiveness of oxaliplatin vs non-oxaliplatin-containing adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104(3):211-27.
 124. Schmoll HJ, Twelves C, Sun W, O'Connell MJ, Cartwright T, McKenna E, et al. Effect of adjuvant capecitabine or fluorouracil, with or without oxaliplatin, on survival outcomes in stage III coloncancer and the effect of oxaliplatin on post-relapse survival: a pooled analysis of individual patient data from four randomised controlled trials. *Lancet Oncol* 2014; 15(13):1481-92.
 125. Saltz LB, Niedzwiecki D, Hollis D, Goldberg RM, Hantel A, Thomas JP, et al. Irinotecan, fluorouracil plus leucovorin is not superior to fluorouracil plus leucovorin alone as adjuvant treatment for stage III colon cancer: results of CALGB 89803. *J Clin Oncol* 2007; 25(23):3456-61.

126. Papadimitriou CA, Papakostas P, Karina M, Malettou L, Dimopoulos MA, Pentheroudakis G, et al. A randomized phase III trial of adjuvant chemotherapy with irinotecan, leucovorin and fluorouracil versus leucovorin and fluorouracil for stage II and III colon cancer: a Hellenic Cooperative Oncology Group study. *BMC Med* 2011;9:10.
127. Van Cutsem E, Labianca R, Bodoky G, Barone C, Aranda E, Nordlinger B, et al. Randomized phase III trial comparing biweekly infusional fluorouracil/leucovorin alone or with irinotecan in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: PETACC-3. *J Clin Oncol* 2009; 27(19):3117-25.
128. Ychou M, Raoul JL, Douillard JY, Gourgou-Bourgade S, Bugat R, Mineur L, et al. A phase III randomised trial of LV5FU2+irinotecan versus LV5FU2 alone in adjuvant high-risk colon cancer (FNCLCC Accord02/FFCD9802). *Ann Oncol* 2009; 20(4):674-80.
129. Allegra CJ, Yothers G, O'Connell MJ, Sharif S, Petrelli NJ, Lopa SH, et al. Bevacizumab in stage II-III colon cancer: 5-year update of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project C-08 trial. *J Clin Oncol* 2013; 31(3):359-64.
130. Ting DT, Ryan DP. The wide gulf between stage III and stage IV colon cancer. *Lancet Oncol* 2014; 15 (8):785-86.
131. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Tangen CM, et al. Intergroup study of fluorouracil plus levamisole as adjuvant therapy for stage II/Dukes' B2 colon cancer. *J Clin Oncol* 1995; 13(12):2936-43.
132. Quasar Collaborative Group, Gray R, Barnwell J, McConkey C, Hills RK, Williams NS, Kerr DJ. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet* 2007; 370 (9604): 2020-29.
133. Schippinger W, Samonigg H, Schabert-Moser R, Greil R, Thödtmann R, Tschmelitsch J, et al. A prospective randomised phase III trial of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil and leucovorin in patients with stage II colon cancer. *Br J Cancer* 2007; 97(8):1021-27.
134. Figueredo A, Charette ML, Maroun J, Brouwers MC, Zuraw L. Adjuvant therapy for stage II colon cancer: a systematic review from the Cancer Care Ontario Program in evidence-based care's gastrointestinal cancer disease site group. *J Clin Oncol* 2004; 22(16):3395-407.
135. Gill S, Loprinzi CL, Sargent DJ, Thomé SD, Alberts SR, Haller DG, et al. Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much? *J Clin Oncol* 2004; 22(10): 1797-806.
136. Mamounas E, Wieand S, Wolkmark N, Bear HD, Atkins JN, Song K, et al. Comparative efficacy of adjuvant chemotherapy in patients with Dukes' B versus Dukes' C colon cancer: results from four National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project adjuvant studies (C-01, C-02, C-03, and C-04). *J Clin Oncol* 1999; 17(5):1349-55.
137. Figueredo A, Coombes ME, Mukherjee S. Adjuvant therapy for completely resected stage II colon cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2008; 16(3):CD005390.
138. Wu X, Zhang J, He X, Wang C, Lian L, Liu H, et al. Postoperative adjuvant chemotherapy for stage II colorectal cancer: a systematic review of 12 randomized controlled trials. *J Gastrointest Surg* 2012; 16(3):646-55.
139. O'Connor ES, Greenblatt DY, LoConte NK, Gangnon RE, Liou JI, Heise CP, et al. Adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer with poor prognostic features. *J Clin Oncol* 2011; 29(25):3381-88.
140. Tournigand C, André T, Bonnetain F, Chibaudel B, Lledo G, Hickish T, et al. Adjuvant therapy with fluorouracil and oxaliplatin in stage II and elderly patients (between ages 70 and 75) with colon cancer: subgroup analyses of the multicenter international study of oxaliplatin, fluorouracil and leucovorin in the adjuvant treatment of colon cancer trial. *J Clin Oncol* 2012; 30(27):3353-60.
141. Tournigand C, de Gramont A. Chemotherapy: Is adjuvant chemotherapy an option for stage II colon cancer? *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8(10):574-76.
142. Grande R, Corsi D, Mancini R, Gemma D, Ciancola F, Sperduti I, et al. Evaluation of relapse-free survival in T3N0 colon cancer: the role of chemotherapy, a multicentric retrospective analysis. *PLoS One* 2013; 8(12): e80188.
143. Santos C, López-Doriga A, Navarro M, Mateo J, Biondo S, Martínez Villacampa M, et al. Clinico-pathological risk factors of stage II colon cancer: results of a prospective study. *Colorectal Dis* 2012; 15(4):414-22.
144. Langner C, Harbaum L, Pollheimer MJ, Kornprat P, Lindtner RA, Schlemmer A, et al. Mucinous differentiation in colorectal cancer-indicator of poor prognosis? *Histopathology* 2012; 60(7):1060-72.
145. Verhulst J, Ferdinande L, Demetter P, Ceelen W. Mucinous subtype as prognostic factor in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Pathol* 2012; 65(5):381-88.
146. Nitsche U, Zimmermann A, Späth C, Müller T, Maak M, Schuster T, et al. Mucinous and signet-ring cell colorectal cancers differ from classical adenocarcinomas in tumor biology and prognosis. *Ann Surg* 2013; 258 (5):775-782.
147. Vather R, Sammour T, Kahokehr A, Connolly AB, Hill AG. Lymph node evaluation and long-term survival in stage II and stage III colon cancer: a national study. *Ann Surg Oncol* 2009; 16(3):585-93.
148. Huh JW, Oh BR, Kim HR, Kim YJ. Preoperative carcinoembryonic antigen level as an independent prognostic factor in potentially curative colon cancer. *J Surg Oncol* 2010; 101(5):396-400.
149. Kirat HT, Ozturk E, Lavery IC, Kiran RP. The predictive value of preoperative carcinoembryonic antigen level in the prognosis of colon cancer. *Am J Surg* 2012; 204(4):447-52.
150. Kim CW, Yoon YS, Park IJ, Lim SB, Yu CS, Kim JC. Elevation of preoperative s-CEA concentration in stage IIA colorectal cancer can also be a high risk factor for stage II patients. *Ann Surg Oncol* 2013; 20(9):2914-20.
151. Nicastrì DG, Doucette JT, Godfrey TE, Hughes SJ. Is occult lymph node disease in colorectal cancer patients clinically significant? A review of the relevant literature. *J Mol Diagn* 2007; 9(5):563-71.
152. Meropol NJ. Ongoing challenge of stage II colon cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29 (25):3346-48.

153. Benson AB 3rd, Bekaii-Saab T, Chan E, Chen YJ, Choti MA, Cooper HS, et al. Localized colon cancer, version 3.2013: featured updates to the NCCN Guidelines. *J Natl Compr Canc Netw* 2013; 11(5):519-28.
154. Ahnen DJ, Wade SW, Jones WF, Sifri R, Mendoza Silveiras J, Greenamyer J, et al. The increasing incidence of young-onset colorectal cancer: a call to action. *Mayo Clin Proc* 2014; 89(2):216-24.
155. You YN, Xing Y, Feig BW, Chang GJ, Cormier JN. Young-onset colorectal cancer: is it time to pay attention? *Arch Intern Med* 2012; 172(3):287-89.
156. Chang DT, Pai RK, Rybichi LA, Dimaio MA, Limaye M, Jayachandran P, et al. Clinicopathologic and molecular features of sporadic early-onset colorectal adenocarcinoma: an adenocarcinoma with frequent signet cell differentiation, rectal and sigmoid involvement, and adverse morphologic features. *Mod Pathol* 2012; 25(8):1128-39.
157. Karsten B, Kim J, King J, Kumar RR. Characteristics of colorectal cancer in young patients at an urban country hospital. *Am Surg* 2008; 74(10):973-76.
158. O'Connell JB, Maggard MA, Liu JH, Etzioni DA, Livingston EH, Ko CY, et al. Do young colon cancer patients have worse outcomes? *World J Surg* 2004; 28(6):558-62.
159. Zbuk K, Sidebotham EL, Bleyer A, La Quaglia MP. Colorectal cancer in young adults. *Semin Oncol* 2009; 36(5):439-50.
160. Sargent DJ, Goldberg RM, Jacobson SD, Macdonald JS, Labianca R, Haller DG, et al. A pooled analysis of adjuvant chemotherapy for resected colon cancer in elderly patients. *N Engl J Med* 2001; 354(15):1091-97.
161. Goldberg RM, Tabah-Fisch I, Bleiberg H, de Gramont A, Tournigand C, Andre T, et al. Pooled analysis of safety and efficacy of oxaliplatin plus fluorouracil/leucovorin administered bimonthly in elderly patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24(25):4085-91.
162. Watanabe T, Wu T-T, Catalano PJ, Ueki T, Satriano R, Haller DG, et al. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2001; 344(16):1196-206.
163. Koo JH, Jalaludin B, Wong SK, Kneebone A, Connor SJ, Leong RW. Improved survival in young women with colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 2008; 103(6):1488-95.
164. Koo JH, Leong RW. Sex differences in epidemiological, clinical and pathological characteristics of colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25(1):33-42.
165. Hendifar A, Yang D, Lez F, Lurje G, Pohl A, Lenz A, et al. Gender disparities in metastatic colorectal cancer survival. *Clin Cancer Res* 2009; 15(20):6391-97.
166. Sloan JA, Goldberg RM, Sargent DJ, Vargas-Chanes D, Nair S, Cha SS, et al. Women experience greater toxicity with fluorouracil-based chemotherapy for colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20(6):1491-98.
167. Chansky K, Benedetti J, Macdonald JS. Differences in toxicity between men and women treated with 5-fluorouracil therapy for colorectal carcinoma. *Cancer* 2005; 103(6):1165-71.
168. Phatak UR, Kao LS, Millas SG, Wiatrek RL, Ko TC, Wray CJ. Interaction between age and race alters predicted survival in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2013; 20(11):3363-69.
169. Aizer AA, Wilhite TJ, Chen MH, Graham PL, Choueiri TK, Hoffman KE, et al. Lack of reduction in racial disparities in cancer-specific mortality over a 20-year period. *Cancer* 2014; 120(10):1532-39.
170. Doubeni CA, Field TS, Buist DS, Korner EJ, Bigelow C, Lamerato L, et al. Racial differences in tumor stage and survival for colorectal cancer in an insured population. *Cancer* 2007; 109(3):612-20.
171. Le H, Ziogas A, Lipkin SM, Zell JA. Effects of socioeconomic status and treatment disparities in colorectal cancer survival. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17(8): 1950-62.
172. Chien C, Morimoto LM, Tom J, Li CL. Differences in colorectal carcinoma stage and survival by race and ethnicity. *Cancer* 2005; 104(3):629-39.
173. White A, Vernon SW, Franzini L, Du XL. Racial disparities in colorectal cancer survival: to what extent are racial disparities explained by differences in treatment, tumor characteristics, or hospital characteristics? *Cancer* 2010; 116(19):4622-31.
174. Yothers G, Sargent DJ, Wolmark N, Goldberg RM, O'Connell MJ, Benedetti JK, et al. Outcomes among black patients with stage II and III colon cancer receiving chemotherapy: an analysis of ACCENT adjuvant trials. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103(20):1498-506.
175. Dignam JJ, Colangelo L, Tian W, Jones J, Smith R, Wickerham DL, et al. Outcomes among African-Americans and Caucasians in colon cancer adjuvant therapy trials: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(22):1933-40.
176. Dignam JJ, Ye Y, Colangelo L, Smith R, Mamounas EP, Wieand HS, et al. Prognosis after rectal cancer in blacks and whites participating in adjuvant therapy randomized trials. *J Clin Oncol* 2003; 21(3):413-20.
177. Alexander D, Jhala N, Chatla C, Steinhauer J, Funkhouser E, Coffey CS, et al. High-grade tumor differentiation is an indicator of poor prognosis in African Americans with colonic adenocarcinomas. *Cancer* 2005; 103(10):2163-70.
178. Carethers JM, Murali B, Yang B, Doctolero RT, Tajima A, Basa R, et al. Influence of race on microsatellite instability and CD8+ T cell infiltration in colon cancer. *PLoS One* 2014; 9(6):e100461.
179. Hass JS, Brawarsky P, Iyer A, Fitzmaurice GM, Neville BA, Earle C. Association of area sociodemographic characteristics and capacity for treatment with disparities in colorectal cancer care and mortality. *Cancer* 2011; 117(18):4267-76.
180. Du XL, Meyer TM, Franzini L. Meta-analysis of racial disparities in survival in association with socioeconomic status among men and women with colon cancer. *Cancer* 2007; 109(11):2161-70.

181. Gill AA, Enewold L, Zahm SH, Shriver CD, Stojadinovic A, McGlynn KA, et al. Colon cancer treatment: are there racial disparities in an equal-access healthcare system? *Dis Colon Rectum* 2014; 57(9):1059-65.
182. Jessup JM, Stewart A, Greene FL, Minsky BD. Adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer: implications of race/ethnicity, age, and differentiation. *JAMA* 2005; 294(21):2703-11.
183. Rolnick S, Hensley Alford S, Kucera GP, Fortman K, Ulcickas Yood M, et al. Racial and age differences in colon examination surveillance following a diagnosis of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2005; 35:96-101.
184. Laiyemo AO, Doubeni C, Pinsky PF, Doria-Rose VP, Bresalier R, Lamerato LE, et al. Race and colorectal cancer disparities: health-care utilization vs different cancer susceptibilities. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102(8):538-46.
185. White A, Vernon SW, Franzini L, Du XL. Racial and ethnic disparities in colorectal cancer screening persisted despite expansion of Medicare's screening reimbursement. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 20(5):811-17.
186. Sanoff H, Sargent DJ, Green EM, McLeod HM, Goldberg RM. Racial differences in advanced colorectal cancer outcomes and pharmacogenetics: a subgroup analysis of a large randomized clinical trial. *J Clin Oncol* 2009; 27(25):4109-15.
187. Mattison LK, Fourie J, Desmond RA, Modak A, Saif MW, Diasio RB. Increased prevalence of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency in African-Americans compared with Caucasians. *Clin Cancer Res* 2006; 12(18):5491-95.
188. Vargas T, Moreno-Rubio J, Herranz J, Cejas P, Molina S, González-Vallinas M, et al. Genes associated with metabolic syndrome predict disease-free survival in stage II colorectal cancer patients. A novel link between metabolic dysregulation and colorectal cancer. *Mol Oncol* 2014;8(8):1469-81.
189. Bardou M, Barkun AN, Martel M. Obesity and colorectal cancer. *Gut* 2013; 62(6):933-47.
190. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body mass index and incidence of cancer: A systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 2008; 371(9612):569-78.
191. Esposito K, Chiodini P, Capuano A, Bellastella G, Maiorino MI, Rafaniello C, et al. Colorectal cancer association with metabolic syndrome and its components: a systematic review with meta-analysis. *Endocrine* 2013; 44(3):634-47.
192. Yang Y, Mauldin PD, Ebeling M, Hulsey TC, Liu B, Thomas MB, et al. Effect of metabolic syndrome and its components on recurrence and survival in colon cancer patients. *Cancer* 2013; 119(8):1512-20.
193. Sinicrope FA, Foster NR, Yothers G, Benson A, Seitz JF, Labianca R, et al. Body mass index at diagnosis and survival among colon cancer patients enrolled in clinical trials of adjuvant chemotherapy. *Cancer* 2013; 119(8):1528-36.
194. Meyerhardt JA, Niedzwiecki D, Hollis D, Saltz LB, Mayer RJ, Nelson H, et al. Impact of body mass index and weight change after treatment on cancer recurrence and survival in patients with stage III colon cancer: findings from Cancer and Leukemia Group B 89803. *J Clin Oncol* 2008; 26(25):4109-15.
195. Park SM, Lim MK, Shin SA, Yun YH. Impact of prediagnosis smoking, alcohol, obesity, and insulin resistance on survival in male cancer patients: National Health Insurance Corporation Study. *J Clin Oncol* 2006; 24 (31):5017-5024.
196. Sinicrope FA, Foster NR, Sargent DJ, O'Connell MJ, Rankin C, et al. Obesity is an independent prognostic variable in colon cancer survivors. *Clin Cancer Res* 2010; 16(6): 1884-93.
197. Sinicrope FA, Foster NR, Yoon HH, Smyrk TC, Kim GP, Allegra CJ, et al. Association of obesity with DNA mismatch repair status and clinical outcome in patients with stage II or III colon carcinoma participating in NCCTG and NSABP adjuvant chemotherapy trials. *J Clin Oncol* 2012; 30(4):406-12.
198. Renehan AG, Roberts DL, Dive C. Obesity and cancer: Pathophysiological and biological mechanisms. *Arch Physiol Biochem* 2008; 114(1):71-83.
199. Sandhu MS, Dunger DB, Giovannucci EL. Insulin, insulin like growth factor-I (IGF-I), IGF binding proteins, their biologic interactions, and colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94(13):972-80.
200. Paulus JK, Cossor FI, Williams CD, Martell RE, Kelley MJ. Metformin (M), diabetes (DM), and colorectal cancer (CRC) survival among US veterans. *J Clin Oncol* 2014; 32:5s (suppl; abstr 3535).
201. Byeon JS, Jeong JY, Kim MJ, Lee SM, Nam WH, Myung SJ, et al. Adiponectin and adiponectin receptor in relation to colorectal cancer progression. *Int J Cancer* 2010; 127(12):2758-67.
202. Volkova E, Willis JA, Wells JE, Robinson BA, Dachs GU, Currie MJ. Association of angiopoietin-2, C-reactive protein and markers of obesity and insulin resistance with survival outcome in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2011; 104(1):51-59.
203. Vermorken AJ, Zhu J, Andr  s E. Obesity and colorectal cancer risk: the role of oxidative stress. *Gut* 2014; 63(3):529-30.
204. Fabbri E, Cella M, McCartney SA, Fuchs A, Abumrad NA, Pietka TA, et al. Association between specific adipose tissue CD4+ T-cell populations and insulin resistance in obese individuals. *Gastroenterology* 2013; 145(2):366-74.
205. Faruk Aykan N, Yildiz I, Sen F, Kilic L, Keskin S, Ciftci R, et al. Effect of increased body mass index (BMI) on time to tumour progression (TTP) in unresectable metastatic colorectal cancer (mCRC) patients treated with bevacizumab-based therapy. *Med Oncol* 2013; 30(3):679.
206. Kornprat P, Pollheimer MJ, Lindtner RA, Schlemmer A, Rehak P, Langner C. Value of tumor size as a prognostic variable in colorectal cancer: a critical reappraisal. *Am J Clin Oncol* 2011; 34(1):43-49.
207. Panarelli NC, Schreiner AM, Brandt SM, Shepherd NA, Yantiss RK. Histologic features and cytologic techniques that aid pathologic stage assessment of colonic adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2013; 37(8):1252-58.
208. Johnson PM, Porter GA, Ricciardi R, Baxter NN. Increasing negative lymph node count is independently associated with improved long-term survival in stage IIIB and IIIC colon cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24(22):3570-75.

209. Bilimoria KY, Palis B, Stewart AK, Bentrem DJ, Freil AC, Sigurdson ER, et al. Impact of tumor location on nodal evaluation for colon cancer. *Dis Colon Rectum* 2008; 51(2):154-61.
210. Baxter NN, Ricciardi R, Simunovic M, Urbach DR, Virnig BA. An evaluation of the relationship between lymph node number and staging in pT3 colon cancer using population-based data. *Dis Colon Rectum* 2010; 53 (1):65-70.
211. Lykke J, Roikjaer O, Jess P; Danish Colorectal Cancer Group. The relation between lymph node status and survival in Stage I-III colon cancer: results from a prospective nationwide cohort study. *Colorectal Dis* 2013; 15(5):559-65.
212. Rosenberg R, Engel J, Bruns C, Heitland W, Hermes N, Jauch KW, et al. The prognostic value of lymph node ratio in a population-based collective of colorectal cancer patients. *Ann Surg* 2010; 251(6):1070-78.
213. Ceelen W, Van Nieuwenhove Y, Pattyn P. Prognostic value of the lymph node ratio in stage III colorectal cancer: a systematic review. *Ann Surg Oncol* 2010; 17(11):2847-55.
214. Stanisavljević L, Søndena K, Storli KE, Leh S, Nesvik I, Gudlaugsson E, et al. The total number of lymph nodes in resected colon cancer specimens is affected by several factors but the lymph node ratio is independent of these. *APMIS* 2014; 122(6):490-98.
215. Gleisner AL, Mogal H, Dodson R, Efron J, Gearhart S, Wick E, et al. Nodal status, number of lymph nodes examined, and lymph node ratio: what defines prognosis after resection of colon adenocarcinoma? *J Am Coll Surg* 2013; 217(6):1090-1100.
216. Lo DS, Pollett A, Siu LL, Gallinger S, Burkes RL. Prognostic significance of mesenteric tumor nodules in patients with stage III colorectal cancer. *Cancer* 2008; 112(1): 50-54.
217. Belt EJ, van Stijn MF, Bril H, de Lange-de Klerk ES, Meijer GA, Meijer S, et al. Lymph node negative colorectal cancers with isolated tumor deposits should be classified and treated as stage III. *Ann Surg Oncol* 2010; 17 (12):3203-11.
218. Nagtegaal ID, Tot T, Jayne DG, McShane P, Nihlberg A, Marshall HC, et al. Lymph nodes, tumor deposits, and TNM: are we getting better? *J Clin Oncol* 2011; 29(18):2487-92.
219. Song YX, Gao P, Wang ZN, Liang JW, Sun Z, Wang MX, et al. Can the tumor deposits be counted as metastatic lymph nodes in the UICC TNM staging system for colorectal cancer? *PLoS One* 2012; 7(3):e34087.
220. Hyslop T, Waldman SA. Guanylyl cyclase C as a biomarker in colorectal cancer. *Biomark Med* 2013; 7(1):159-67.
221. Gill S, Haine JF, Shi Q, Pavay ES, Beaundry G, Sargent DJ. Prognostic value of molecular detection of lymph node metastases after curative resection of stage II colon cancer: A systematic pooled data analysis. *Clin Colorectal Cancer* 2014 [Epub ahead of print].
222. Sargent DJ, Shi Q, Gill S, Louvet C, Everson RB, Kellner U, et al. Molecular testing for lymph node metastases as a determinant of colon cancer recurrence: results from a retrospective multicenter study. *Clin Cancer Res* 2014; 20(16):4361-69.
223. Mescoli C, Albertoni L, Pucciarelli S, Giacomelli L, Russo VM, Fassan M, et al. Isolated tumor cells in regional lymph nodes as relapse predictors in stage I and II colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2012; 30(9):965-71.
224. Birkenkamp-Demtroder K, Olesen SH, Sørensen FB, Laurberg S, Laiho P, Aaltonen LA et al. Differential gene expression in colon cancer of the caecum versus the sigmoid and rectosigmoid. *Gut* 2005; 54(3):374-84.
225. Maus MK, Hanna DL, Stephens CL, Astrow SH, Yang D, Grimminger PP, et al. Distinct gene expression profiles of proximal and distal colorectal cancer: implications for cytotoxic and targeted therapy. *Pharmacogenomics J* 2014 [Epub ahead of print].
226. Yamauchi M, Morikawa T, Kuchiba A, Imamura Y, Qian ZR, Nishihara R. Assessment of colorectal cancer molecular features along bowel subsites challenges the conception of distinct dichotomy of proximal versus distal colorectum. *Gut* 2012; 61(6):847-54.
227. Meguid RA, Slidell MB, Wolfgang CL, Chang DC, Ahuja N. Is there a difference in survival between right-versus left sided colon cancers? *Ann Surg Oncol* 2008; 15(9):2388-94.
228. Benedix F, Kube R, Meyer F, Schmidt U, Gastinger I, Lippert H; Colon/Rectum Carcinomas (Primary Tumor) Study Group. Comparison of 17,641 patients with right- and left-sided colon cancer: Differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival. *Dis Colon Rectum* 2010; 53(1):57-64.
229. Weiss JM, Pfau PR, O'Connor ES, King J, LoConte N, Kennedy G, et al. Mortality by stage for right- versus left-sided colon cancer: analysis of Surveillance, Epidemiology, and End Results-Medicare Data. *J Clin Oncol* 2011; 29 (33):4401-09.
230. Powell AG, Wallace R, McKee RF, Anderson JH, Going JJ, Edwards J, et al. The relationship between tumour site, clinicopathological characteristics and cancer-specific survival in patients undergoing surgery for colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2012; 14(12):1493-99.
231. Suttie SA, Shaikh I, Mullen R, Amin AI, Daniel T, Yalamarthy S. Outcome of right- and left-sided colonic and rectal cancer following surgical resection. *Colorectal Dis* 2011; 13(8):884-89.
232. Jernvall P, Mäkinen MJ, Karttunen TJ, Mäkelä J, Vihko P. Microsatellite instability: Impact on cancer progression in proximal and distal colorectal cancers. *Eur J Cancer* 1999; 35(2):197-201.
233. Malesci A, Laghi L, Bianchi P, Delconte G, Randolph A, Torri V, et al. Reduced likelihood of metastases in patients with microsatellite unstable colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13(13):3831-39.
234. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003; 349(3):247-57.

235. Samowitz WS, Curtin K, Ma KN, Schaffer D, Coleman LW, Leppert M, et al. Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10(9):917-23.
236. Sondenaa K, Quirke P, Hohenberger W, Sugihara K, Kobayashi H, Kessler H, et al. The rationale behind complete mesocolic excision (CME) and a central vascular ligation for colon cancer in open and laparoscopic surgery: proceedings of a consensus conference. *Int J Colorectal Dis* 2014; 29(4):419-28.
237. Hohenberger W, Weber K, Matzel K, Papadopoulos T, Merkel S. Standardized surgery for colonic cancer: complete mesocolic excision and central ligation-technical notes and outcomes. *Colorectal Dis* 2009; 11(4):354-64.
238. West NP, Hohenberger W, Weber K, Perrakis A, Finan PJ, Quirke P. Complete mesocolic excision with central vascular ligation produces an oncologically superior specimen compared with standard surgery for carcinoma of the colon. *J Clin Oncol* 2010; 28(2):272-78.
239. Wittekind C, Compton CC, Greene FL, Sobin LH. TNM residual tumor classification revisited. *Cancer* 2002; 94(9):2511-16.
240. Ang CW, Tweedle EM, Campbell F, Rooney PS. Apical node metastasis independently predicts poor survival in Dukes C colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2011; 13(5):526-31.
241. Kim BC. Prognostic significance of tumor regression grade after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *J Korean Soc Coloproctol* 2011; 27(1):1-2.
242. Lee YC, Hsieh CC, Chuang JP. Prognostic significance of partial tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2013; 56(9):1093-101.
243. Min BS, Kim NK, Ko YT, Baek SH, Lee KY, Sohn SK, et al. Clinicopathological features of signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum: a case-matched study. *Hepatogastroenterology* 2009; 56(93):984-88.
244. Kang H, O'Connell JB, Maggard MA, Sack J, Ko CY. A 10-year outcomes evaluation of mucinous and signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum. *Dis Colon Rectum* 2005; 48(6):1161-68.
245. Hugen N, Verhoeven RH, Lemmens VE, van Aart CJ, Elferink MA, Radema SA, et al. Colorectal signet-ring cell carcinoma: benefit from adjuvant chemotherapy but a poor prognostic factor. *Int J Cancer* 2015; 136(2):333-39.
246. Frizelle FA, Hobday KS, Batts KP, Nelson H. Adenosquamous and squamous carcinoma of the colon and upper rectum: a clinical and histopathologic study. *Dis Colon Rectum* 2001; 44(3):341-46.
247. Masoomi H, Ziogas A, Lin BS, Barleben A, Mills S, Stamos MJ, et al. Population-based evaluation of adenosquamous carcinoma of the colon and rectum. *Dis Colon Rectum* 2012; 55(5):509-14.
248. Grabowski P, Schindler I, Anagnostopoulos I, Foss HD, Riecken EO, Mansmann U, et al. Neuroendocrine differentiation is a relevant prognostic factor in stage III-IV colorectal cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13(4):405-11.
249. Grabowski P, Sturn I, Schelwies K, Maaser K, Buhr HJ, Dörken B, et al. Analysis of neuroendocrine differentiation and the p53/BAX pathway in UICC stage III colorectal carcinoma identifies patients with good prognosis. *Int J Colorectal Dis* 2006; 21(3):221-30.
250. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124(7):979-94.
251. Maisano R, Azzarello D, Maisano M, Mafodda A, Bottari M, Eggitto G, et al. Mucinous histology of colon cancer predicts poor outcomes with FOLFOX regimen in metastatic colon cancer. *J Chemother* 2012; 24(4):212-16.
252. Consorti F, Lorenzotti A, Midiri G, Di Paola M. Prognostic significance of mucinous carcinoma of colon and rectum: a prospective case-control study. *J Surg Oncol* 2000; 73(2):70-4.
253. Shin US, Yu CS, Kim JH, Kim TW, Lim SB, Yoon SN, et al. Mucinous rectal cancer: effectiveness of preoperative chemoradiotherapy and prognosis. *Ann Surg Oncol* 2011; 18(8):2232-39.
254. Kim SH, Shin SJ, Lee KY, Kim H, Kim TI, Kang DR. Prognostic value of mucinous histology depends on microsatellite instability status in patients with stage III colon cancer treated with adjuvant FOLFOX chemotherapy: a retrospective cohort study. *Ann Surg Oncol* 2013; 20(11):3407-13.
255. Lee DW, Han SW, Lee HJ, Rhee YY, Bae JM, Cho NY, et al. Prognostic implication of mucinous histology in colorectal cancer patients treated with adjuvant FOLFOX chemotherapy. *Br J Cancer* 2013; 108(10):1978-84.
356. Hugen N, Verhoeven RH, Radema SA, de Hingh IH, Puijt JF, Nagtegaal ID, et al. Prognosis and value of adjuvant chemotherapy in stage III mucinous colorectal carcinoma. *Ann Oncol* 2013; 24(11):2819-24.
257. Sinicrope FA, Foster NR, Thibodeau SN, Marsoni S, Monges G, Labianca R, et al. DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5-fluorouracil-based adjuvant therapy. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103(11):863-75.
258. Cho YB, Yang SS, Lee WY, Song SY, Kim SH, Shin HJ, et al. The clinical significance of neuroendocrine differentiation in T3-T4 node-negative colorectal cancer. *Int J Surg Pathol* 2010; 18(3):201-6.
259. Newland RC, Dent OF, Lyttle MN, Chapuis PH, Bokey EL. Pathologic determinants of survival associated with colorectal cancer with lymph node metastases. A multivariate analysis of 579 patients. *Cancer* 1994; 73(8):2076-82.
260. Goldstein NS, Hart J. Histologic features associated with lymph node metastasis in stage T1 and superficial T2 rectal adenocarcinomas in abdominoperineal resection specimens. Identifying a subset of patients for whom treatment with adjuvant therapy or completion abdominoperineal resection should be considered after local excision. *Am J Clin Pathol* 1999; 111(1):51-8.

261. Rupa JD, de Bruïne AP, Gerbers AJ, Leers MP, Nap M, Kessels AG, et al. Simultaneous detection of apoptosis and proliferation in colorectal carcinoma by multiparameter flow cytometry allows separation of high and low-turnover tumors with distinct clinical outcome. *Cancer* 2003; 97(10):2404-11.
262. Garrity MM, Burgart LJ, Mahoney MR, Windschitl HE, Salim M, Wiesenfeld M, et al. Prognostic value of proliferation, apoptosis, defective DNA mismatch repair, and p53 overexpression in patients with resected Dukes' B2 or C colon cancer: a North Central Cancer Treatment Group Study. *J Clin Oncol* 2004; 22(9):1572-82.
263. Menezes HL, Jucá MJ, Gomes EG, Nunes BL, Costa HO, Matos D. Analysis of the immunohistochemical expressions of p53, bcl-2 and Ki-67 in colorectal adenocarcinoma and their correlations with the prognostic factors. *Arq Gastroenterol* 2010; 47(2):141-47.
364. Allegra CJ, Paik S, Colangelo LH, Parr AL, Kirsch I, Kim G, et al. Prognostic value of thymidylate synthase, Ki-67, and p53 in patients with Dukes' B and C colon cancer: A National Cancer Institute- National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project collaborative study. *J Clin Oncol* 2003; 21(2):241-50.
265. Chen HS, Sheen-Chen SM, Lu CC. DNA index and S-phase fraction in curative resection of colorectal adenocarcinoma: analysis of prognosis and current trends. *World J Surg* 2002; 26(5):626-30.
266. Geido E, Sciutto A, Rubagotti A, Oliani C, Monaco R, Risio M, et al. Combined DNA flow cytometry and sorting with k-ras2 mutation spectrum analysis and the prognosis of human sporadic colorectal cancer. *Cytometry* 2002; 50(4):216-24.
267. Lin CC, Lin JK, Chang SC, Wang HS, Yang SH, Jiang JK, et al. Is adjuvant chemotherapy beneficial to high risk stage II colon cancer? Analysis in a single institute. *Int J Colorectal Dis* 2009;24(6):665-76.
268. Desolneux G, Burtin P, Lermite E, Bergamaschi R, Hamy A, Arnaud JP. Prognostic factors in node-negative colorectal cancer: a retrospective study from a prospective database. *Int J Colorectal Dis* 2010; 25(7):829-34.
269. Messenger DE, Driman DK, Kirsch R. Developments in the assessment of venous invasion in colorectal cancer: implications for future practice and patient outcome. *Hum Pathol* 2012; 43(7):965-73.
270. Sato T, Ueno H, Mochizuki H, Shinto E, Hashiguchi Y, Kajiwara Y, et al. Objective criteria for the grading of venous invasion in colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 2010; 34(4):454-62.
271. Suzuki A, Togashi K, Nokubi M, Koinuma K, Miyakura Y, Horie H, et al. Evaluation of venous invasion by Elastic van Gieson stain and tumor budding predicts local and distant metastases in patients with T1 stage colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 2009; 33(11):1601-07.
272. Liang P, Nakada I, Hong JW, Tabuchi T, Motohashi G, Takemura A, et al. Prognostic significance of immunohistochemically detected blood and lymphatic vessel invasion in colorectal carcinoma: its impact on prognosis. *Ann Surg Oncol* 2007; 14(2):470-77.
273. Lin M, Ma SP, Lin HZ, Ji P, Xie D, Yu JX. Intratumoral as well as peritumoral lymphatic vessel invasion correlates with lymph node metastasis and unfavourable outcome in colorectal cancer. *Clin Exp Metastasis* 2010; 27(3):123-32.
274. Liebig C, Ayala G, Wilks JA, Berger DH, Albo D. Perineural invasion in cancer: A review of the literature. *Cancer* 2009; 115(15):3379-91.
275. Ueno H, Shirouzu K, Eishi Y, Yamada K, Kusumi T, Kushima R, et al. Characterization of perineural invasion as a component of colorectal cancer staging. *Am J Surg Pathol* 2013; 37(10):1542-49.
276. Peng J, Sheng W, Huang D, Venook AP, Xu Y, Guan Z, et al. Perineural invasion in pT3N0 rectal cancer: the incidence and its prognostic effect. *Cancer* 2011; 117(7):1415-21.
277. Ueno H, Shirouzu K, Shimazaki H, Kawachi H, Eishi Y, Ajioka Y, et al. Histogenesis and prognostic value of myenteric spread in colorectal cancer: a Japanese multi-institutional study. *J Gastroenterol* 2014; 49(3):400-07.
278. Zlobec I, Lugli A. Invasive front of colorectal cancer: dynamic interface of pro-/anti-tumor factors. *World J Gastroenterol* 2009; 15(47):5898-906.
279. Koelzer VH, Lugli A. The tumor border configuration of colorectal cancer as a histomorphological prognostic indicator. *Front Oncol* 2014; 18:4:29.
280. Zlobec I, Baker K, Minoo P, Hayashi S, Terracciano L, Lugli A. Tumor border configuration added to TNM staging better stratifies stage II colorectal cancer patients into prognostic subgroups. *Cancer* 2009; 115(17):4021-29.
281. Morikawa T, Kuchiba A, Qian ZR, Mino-Kenudson M, Hornick JL, Yamauchi M, et al. Prognostic significance and molecular associations of tumor growth pattern in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2012; 19(6):1944-56.
282. Ogino S, Nosho K, Irahara N, Meyerhardt JA, Baba Y, Shima K, et al. Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylator phenotype. *Clin Cancer Res* 2009; 15(20):6412-20.
283. Nosho K, Baba Y, Tanaka N, Hayashi M, Meyerhardt JA, et al. Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. *J Pathol* 2010; 222(4):350-66.
284. Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G, Meatchi T, et al. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol* 2011; 29(6):610-18.
285. Greenson JK, Huang SC, Herron C, Moreno V, Bonner JD, Tomsho LP, et al. Pathologic predictors of microsatellite instability in colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 2009; 33(1):126-33.
286. Prall F. Tumour budding in colorectal carcinoma. *Histopathology* 2007; 50(1):151-62.

287. Ohtsuki K, Koyama F, Tamura T, Enomoto Y, Fujii H, Mukogawa T, Nakagawa T, et al. Prognostic value of immunohistochemical analysis of tumor budding in colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 2008; 28(3B):1831-36.
288. Nakamura T, Mitomi H, Kanazawa H, Ohkura Y, Watanabe M. Tumor budding as an index to identify high-risk patients with stage II colon cancer. *Dis Colon Rectum* 2008; 51(5):568-72.
289. Lai YH, Wu LC, Li PS, Wu WH, Yang SB, Xia P, et al. Tumour budding is a reproducible index for risk stratification of patients with Stage II colon cancer. *Colorectal Dis* 2014; 16(4):259-64.
290. Wang LM, Kevans D, Mulcahy H, O'Sullivan J, Fennelly D, Hyland J, et al. Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 2009; 33(1):134-41.
291. Betge J, Kornprat MD, Marion J, Lindtner RA, Schlemmer A, Rehak P, et al. Tumor budding is an independent predictor of outcome in AJCC/UICC stage II colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2012; 19(12):3706-12.
292. Mitrovic B, Schaeffer DF, Riddell RH, Kirsch R. Tumor budding in colorectal carcinoma: time to take notice. *Mod Pathol* 2012; 25(10):1315-25.
293. Halvorsen TB, Seim E. Association between invasiveness, inflammatory reaction, desmoplasia and survival in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 1989; 42(2):162-6.
294. Roncucci L, Fante R, Losi L, Di Gregorio C, Micheli A, Benatti P, et al. Survival for colon and rectal cancer in a population-based cancer registry. *Eur J Cancer* 1996; 32A(2):295-302.
295. Mei Z, Liu Y, Liu C, Cui A, Liang Z, Wang G, et al. Tumour-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer* 2014; 110(6):1595-605.
296. Canna K, McArdle PA, McMillan DC, McNicol AM, Smith GW, McKee RF, et al. The relationship between tumour T-lymphocyte infiltration, the systemic inflammatory response and survival in patients undergoing curative resection for colorectal cancer. *Br J Cancer* 2005; 92(4):651-54.
297. Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005; 353(25):2654-66.
298. Pagès F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, et al. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(35):5944-51.
299. Lee WS, Park S, Lee WY, Yun SH, Chun HK. Clinical impact of tumor-infiltrating lymphocytes for survival in stage II colon cancer. *Cancer* 2010; 116 (22):5188-99.
300. Huh JW, Lee JH, Kim HR. Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes for patients with colorectal cancer. *Arch Surg* 2012; 147(4):366-72.
301. Ladoire S, Martin F, Ghiringhelli F. Prognostic role of FOXP3+ regulatory T cells infiltrating human carcinomas: the paradox of colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2011; 60(7):909-18.
302. Salama P, Phillips M, Grieco F, Morris M, Zeps N, Joseph D, et al. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(2):186-92.
303. De la Chapelle A, Hampel H. Clinical relevance of microsatellite instability in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28(20):3380-87.
304. Lanza G, Gafà R, Santini A, Maestri I, Guerzoni L, Cavazzini L. Immunohistochemical test for MLH1 and MSH2 expression predicts clinical outcome in stage II and III colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 2006; 24 (15):2359-67.
305. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012; 487(7407):330-37.
306. Dienstmann R, Guinney J, Delorenzi M, De Reynies A, Roepman P, Sadanandam A, et al. Colorectal Cancer Subtyping Consortium (CRCSC) identification of a consensus of molecular subtypes. *J Clin Oncol* 2014; 32:5s (suppl; abstr 3511).
307. Sinicrope FA, Shi Q, Smyrk TC, Thibodeau SN, Dienstmann R, Guinney J, et al. Molecular Markers Identify Subtypes of Stage III Colon Cancer Associated With Patient Outcomes. *Gastroenterology* 2015; 148(1):88-99.
308. Phipps AI, Limburg PJ, Baron JA, Burnett-Hartman AN, Weisenberger DJ, Laird PW, et al. Association between molecular subtypes of colorectal cancer and patient survival. *Gastroenterology* 2015; 148(1):77-87.
309. Merok MA, Ahlquist T, Røyrvik EC, Tufteland KF, Hektoen M, Sjø OH, et al. Microsatellite instability has a positive prognostic impact on stage II colorectal cancer after complete resection: results from a large, consecutive Norwegian series. *Ann Oncol* 2013; 24(5):1274-82.
310. Sargent DJ, Shi Q, Yothers G, Tejjap S, Bertagnolli MM, Thibodeau SN, et al. Prognostic impact of deficient mismatch repair (dMMR) in 7,803 stage II/III colon cancer (CC) patients (pts): A pooled individual pt data analysis of 17 adjuvant trials in the ACCENT database. *J Clin Oncol* 2014; 32:5s (suppl; abstr 3507).
311. Popat S, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of the relationship between chromosome 18q genotype, DCC status and colorectal cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2005; 41(14):2060-70.
312. Ogino S, Nishio K, Irahara N, Shima K, Baba Y, Kirkner GJ, et al. Prognostic significance and molecular associations of 18q loss of heterozygosity: a cohort study of microsatellite stable colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(27):4591-98.
313. Bertagnolli MM, Redston M, Compton CC, Niedzwiecki D, Mayer RJ, Goldberg RM, et al. Microsatellite instability and loss of heterozygosity at chromosomal location 18q: prospective evaluation of biomarkers for stage II and III colon cancer-A study of CALGB 9581 and 89803. *J Clin Oncol* 2011; 29(23):3153-62.
314. Roth AD, Tejjap S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel D, et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol* 2010; 28(3):466-74.

315. Ogino S, Meyerhardt JA, Irahara N, Niedzwiecki D, Hollis D, Saltz LB, et al. KRAS mutation in stage III colon cancer and clinical outcome following intergroup trial CALGB 89803. *Clin Cancer Res* 2009; 15(23):7322-29.
316. Blons H, Emile JF, Le Malicot K, Julié C, Zaanan A, Tabernero J et al. Prognostic value of KRAS mutations in stage III colon cancer: post hoc analysis of the PETACC8 phase III trial dataset. *Ann Oncol* 2014; 25(12):2378-85.
317. Yoon HH, Tougeron D, Shi Q, Alberts SR, Mahoney MR, Nelson GD, et al. KRAS codon 12 and 13 mutations in relation to disease-free survival in BRAF-wild-type stage III colon cancers from an adjuvant chemotherapy trial (N0147 alliance). *Clin Cancer Res* 2014; 20(11):3033-43.
318. Ogino S, Shima K, Meyerhardt JA, McCleary NJ, Ng K, Hollis D, et al. Predictive and prognostic roles of BRAF mutations in stage III colon cancer: results from Intergroup Trial CALGB 89803. *Clin Cancer Res* 2011; 18 (3):890-900.
319. Liao X, Morikawa T, Lochhead P, Imamura Y, Kuchiba A, Yamauchi M, et al. Prognostic role of PIK3CA mutation in colorectal cancer: cohort study and literature review. *Clin Cancer Res* 2012; 18(8):2257-68.
320. Ogino S, Liao X, Imamura Y, Yamauchi M, McCleary NJ, Ng K, et al. Predictive and prognostic analysis of PIK3CA mutation in stage III colon cancer intergroup trial. *J Natl Cancer Inst* 2013; 105(23):1789-98.
321. Westra JL, Schaapveld M, Hollema H, de Boer JP, Kraak MM, de Jong D, et al. Determination of TP53 mutation is more relevant than microsatellite instability status for the prediction of disease-free survival in adjuvant-treated stage III colon cancer patients. *J Clin Oncol* 2005; 23(24):5635-43.
322. Shima K, Noshio K, Baba Y, Cantor M, Meyerhardt JA, Giovannucci EL, et al. Prognostic significance of CDKN2A (p16) promoter methylation and loss of expression in 902 colorectal cancers: cohort study and literature review. *Int J Cancer* 2011; 128(5):1080-94.
323. O'Connell MJ, Lavery I, Yothers G, Paik S, Clark-Langone KM, Lopatin M, et al. Relationship between tumor gene expression and recurrence in four independent studies of patients with stage II/III colon cancer treated with surgery alone or surgery plus adjuvant fluorouracil plus leucovorin. *J Clin Oncol* 2010; 28(25):3937-44.
324. Ågesen TH, Sveen A, Merok MA, Lind GE, Nesbakken A, Skotheim RI, et al. ColoGuideEx: a robust gene classifier specific for stage II colorectal cancer prognosis. *Gut* 2012; 61(11):1560-67.
325. Sveen A, Ågesen TH, Nesbakken A, Meling GI, Rognum TO, Liestøl K, et al. ColoGuidePro: a prognostic 7-gene expression signature for stage III colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2012; 18(21):6001-10.
326. Zhang JX, Song W, Chen ZH, Wei JH, Liao YJ, Lei J, et al. Prognostic and predictive value of a microRNA signature in stage II colon cancer: a microRNA expression analysis. *Lancet Oncol* 2013; 14(13):1295-1306.
327. Peach G, Kim C, Zacharakis E, Purkayastha S, Ziprin P. Prognostic significance of circulating tumour cells following surgical resection of colorectal cancers: a systematic review. *Br J Cancer* 2010; 102(9):1327-34.
328. Vardakis N, Messaritakis I, Papadaki C, Agoglossakis G, Sfakianaki M, Saridaki Z, et al. Prognostic significance of the detection of peripheral blood CEACAM5mRNA-positive cells by real-time polymerase chain reaction in operable colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17(1):165-73.
329. Iinuma H, Watanabe T, Mimori K, Adachi M, Hayashi N, Tamura J, et al. Clinical significance of circulating tumor cells, including cancer stem-like cells, in peripheral blood for recurrence and prognosis in patients with Dukes' stage B and C colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29(12):1547-55.
330. Sotelo MJ, Sastre J, Maestro ML, Véganzones S, Viéitez JM, Alonso V, et al. Role of circulating tumor cells as prognostic marker in resected stage III colorectal cancer. *Ann Oncol* 2014 [Epub ahead of print].
331. Roth AD, Delorenzi M, Tejpar S, Yan P, Klingbiel D, Fiocca R, et al. Integrated analysis of molecular and clinical prognostic factors in stage II/III colon cancer. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104(21):1635-46.
332. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for clonal carcinogenesis. *Nature* 1993; 363(6429):558-61.
333. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010; 138(6):2073-87.
334. Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 2008; 135(4):1079-99.
335. Sinicrope FA, Dargent DJ. Molecular pathways: Microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 2012; 18(6):1506-12.
336. Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7(5):335-46.
337. Duval A, Hamelin R. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res* 2002; 62(9):2447-54.
338. Woerner SM, Benner A, Sutter C, Schiller M, Yuan YP, Keller G, et al. Pathogenesis of DNA repair-deficient cancers: a statistical meta-analysis of putative Real Common Target genes. *Oncogene* 2003; 22(15):2226-35.
339. Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR. Review of the Lynch syndrome: History, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet* 2009; 76(1):1-18.
340. Poulagiani G, Frayling IM, Arends MJ. DNA mismatch repair deficiency in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. *Histopathology* 2010; 56(2):167-79.
341. Vilar E, Tabernero J. Molecular dissection of microsatellite instable colorectal cancer. *Cancer Discov* 2013; 3(5):502-11.
342. Laghi L, Bianchi P, Malesci A. Differences and evolution of the methods for the assessment of microsatellite instability. *Oncogene* 2008; 27(49):6313-21.
343. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: Development of

- international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58(22):5248-57.
344. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Ruschhoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(4):261-68.
345. Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, Goldberg RM, Cunningham JM, Sargent DJ, et al. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol* 2002; 20(4):1043-48.
346. Ogino S, Noshio K, Kirkner GJ, Shima K, Irahara N, Kure S, et al. PIK3CA mutation is associated with poor prognosis among patients with curatively resected colon cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(9):1477-84.
347. Parsons DW, Wang TL, Samuels Y, Bardelli A, Cummins JM, DeLong L, et al. Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway. *Nature* 2005; 436(7052):792
348. Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, Young JP, Spurdle AB. Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. *J Med Genet* 2012; 49(3):151-57.
349. Deng G, Bell I, Crawley S, Gum J, Terdiman JP, Allen BA, et al. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10(1 Pt 1):191-95.
350. Bessa X, Ballesté B, Andreu M, Castells A, Bellosillo B, Balaguer F, et al. A prospective, multicenter, population-based study of BRAF mutational analysis for Lynch syndrome screening. *Clin Gastroenterol and Hepatol* 2008; 6(2):206-14.
351. Jung SB, Lee HI, Oh HK, Shin IH, Jeon CH. Clinico-pathologic parameters for prediction of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res Treat* 2012; 44(3):179-86.
352. Roman R, Verdu M, Calvo M, Vidal A, Sanjuan X, Jimeno M, et al. Microsatellite instability of the colorectal carcinoma can be predicted in the conventional pathologic examination. A prospective multicentric study and the statistical analysis of 615 cases consolidate our previously proposed logistic regression model. *Virchows Arch* 2010; 456(5):533-41.
353. Poynter JN, Siegmund KD, Weisenberger DJ, Long TI, Thibodeau SN, Lindor N, et al. Colon Cancer Family Registry Investigators: Molecular characterization of MSI-H colorectal cancer by MLH1 promoter methylation, immunohistochemistry, and mismatch repair germline mutation screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17(1):3208-15.
354. Koopman M, Kortman GA, Mekenkamp L, Ligtenberg MJ, Hoogerbrugge N, Antonini NF, et al. Deficient mismatch repair system in patients with sporadic advanced colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009; 100(2):266-73.
355. Gavin PG, Colangelo LH, Fumagalli D, Tanaka N, Remillard MY, Yothers G, et al. Mutation profiling and microsatellite instability in stage II and III colon cancer: An assessment of their prognostic and oxaliplatin predictive value. *Clin Cancer Res* 2012; 18(23):6531-41.
356. Des Guetz G, Schischmanoff O, Nocalas P, Perret GY, Morere JF, Uzzan B. Does microsatellite instability predict the efficacy of adjuvant chemotherapy in colorectal cancer? A systematic review with meta-analysis. *Eur J Cancer* 2009; 45(10):1890-96.
357. Zaanen A, Fléjou JF, Emile JF, Des GG, Cuilliere-Dartigues P, Malka D, et al. Defective mismatch repair status as a prognostic biomarker of disease-free survival in stage III colon cancer patients treated with adjuvant FOLFOX chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2011; 17(23):7470-78.
358. Sinicrope FA, Mahoney MR, Smyrk TC, Thibodeau SN, Warren RS, Bertagnolli MM, et al. Prognostic impact of deficient DNA mismatch repair in patients with stage III colon cancer from a randomized trial of FOLFOX-based adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 2013; 31(29):3664-72.
359. Kim ST, Lee J, Park SH, Park JO, Lim HY, Kang WK, et al. Clinical impact of microsatellite instability in colon cancer following adjuvant FOLFOX therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 66(4):659-67.
360. Sinicrope FA, Rego RL, Halling KC, Foster N, Sargent DJ, La Plant B, et al. Prognostic impact of microsatellite instability and DNA ploidy in human colon carcinoma patients. *Gastroenterology* 2006; 13 (3): 729-37.
361. Tejpar S, Bosman M, Delorenzi R, Fiocca R, Yan P, Klingbiel D, et al. Microsatellite instability (MSI) in stage II and III colon cancer treated with 5FU-LV or 5FU-LV and irinotecan (PETACC 3-EORTC 40993-SAKK 60/00 trial). *J Clin Oncol* 2009; 27:15s (suppl; abstr 4001).
362. Roth AD, Tejpar S, Yan R, Fiocca R, Dietrich D, Delorenzi M, et al. Stage-specific prognostic value of molecular markers in colon cancer: Results of the translational study on the PETACC 3-EORTC 40993-SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol* 2009; 27:15s (suppl; abstr 4002).
363. Bertagnolli MM, Niedzwiecki D, Compton CC, Hahn HP, Hall M, Damas B, et al. Microsatellite instability predicts improved response to adjuvant therapy with irinotecan, fluorouracil, and leucovorin in stage III colon cancer: Cancer and Leukemia Group B Protocol 89803. *J Clin Oncol* 2009; 27(11):1814-21.
364. Kim GP, Colangelo LH, Wieand HS, Paik S, Kirsch IR, Wolmark N, et al. Prognostic and predictive roles of high-degree microsatellite instability in colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Collaborative Study. *J Clin Oncol* 2007; 25(7):767-72.

365. Jover R, Zapater P, Castells A, Llor X, Andreu M, Cubiella J, et al. The efficacy of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil in colorectal cancer depends on the mismatch repair status. *Eur J Cancer* 2009; 45(3):365-73.
366. Guastadisegni C, Colafranceschi M, Ottini L, Dogliotti E. Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta-analysis of colorectal cancers survival data. *Eur J Cancer* 2010; 46(15):2788-98.
367. Morris M, Platell C, Iacopetta B. Tumor-infiltrating lymphocytes and perforation in colon cancer predict positive response to 5-fluorouracil chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2008; 14(5):1413-17.
368. Tajima A, Iwaizumi M, Tseng-Rogenski S, Cabrera BL, Carethers JM. Both hMutS α and hMutS β DNA mismatch repair complexes participate in 5-fluorouracil cytotoxicity. *PLoS One* 2011; 6(12):e28117.
369. Fischer F, Baerenfaller K, Jiricny J. 5-fluorouracil is efficiently removed from DNA by the base excision repair and mismatch repair systems. *Gastroenterology* 2007; 133(6):1858-68.
370. Flejou JF, Andre T, Chibaudel B, Scriva A, Hickish T, Tabernero J, et al. Effect of adding oxaliplatin to adjuvant 5-fluorouracil/leucovorin (5FU/LV) in patients with defective mismatch repair (dMMR) colon cancer stage II and III included in the MOSAIC study. *J Clin Oncol* 2013; 31 (suppl; abstr 3524).
371. Tougeron D, Sickerson G, Lecomte T, Mouillet G, Trouilloud I, Coriat R, et al. Impact of adjuvant chemotherapy with 5-FU or FOLFOX in colon cancers with microsatellite instability: An AGEO multicenter study. *J Clin Oncol* 2014; 32:5s (suppl; abstr 3508).
372. Vilar E, Scaltriti M, Balmana J, Saura C, Guzman M, Arribas J, et al. Microsatellite instability due to hMLH1 deficiency is associated with increased cytotoxicity to irinotecan in human colorectal cancer cell lines. *Br J Cancer* 2008; 99(10):1607-12.
373. Rodriguez R, Hansen LT, Phear G, Scorah J, Spang-Thomsen M, Cox A, et al. Thymidine selectively enhances growth suppressive effects of camptothecin/irinotecan in MSI+ cells and tumors containing a mutation of MRE11. *Clin Cancer Res* 2008; 14(17):5476-83.
374. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(6):459-65.
375. Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009; 360(14):1408-17.
376. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the "RASCAL II" study. *Br J Cancer* 2001; 85(5): 692-96.
377. Santini D, Loupakis F, Vincenzi B, Floriani I, Stasi I, Canestrari E, et al. High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice. *The Oncologist* 2008; 13(12):1270-75.
378. Gonsalves WI, Mahoney MR, Sargent DJ, Nelson GD, Alberts SR, Sinicrope FA, et al. Patient and tumor characteristics and BRAF and KRAS mutations in colon cancer, NCCTG/Alliance N0147. *J Natl Cancer Inst* 2014; 12:106 (7).
379. Andreyev HJN, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA. Kirsten Ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90(9):675-84.
380. Lee DW, Kim KJ, Han SW, Lee HJ, Rhee YY, Bae JM, et al. KRAS mutation is associated with worse prognosis in stage III or high-risk stage II colon cancer patients treated with adjuvant FOLFOX. *Ann Surg Oncol* 2015; 22(1):187-94.
381. Ahnen DJ, Feigl P, Quan G, Fenoglio-Preiser C, Lovato LC, Bunn PA Jr, et al. Ki-ras mutation and p53 overexpression predict the clinical behavior of colorectal cancer: A Southwest Oncology Group study. *Cancer Res* 1998; 58(6):1149-58.
382. Ryan BM, Lefort F, McManus R, Daly J, Keeling PW, Weir DG, et al. A prospective study of circulating mutant KRAS2 in the serum of patients with colorectal neoplasia: strong prognostic indicator in postoperative follow up. *Gut* 2003; 52(1):101-08.
383. Wang JY, Hsieh JS, Chang MY, Huang TJ, Chen FM, Cheng TL, et al. Molecular detection of APC, K-ras, and p53 mutations in the serum of colorectal cancer patients as circulating biomarkers. *World J Surg* 2004; 28(7):721-26.
384. Oltedal S, Gilie B, Korner H, Aasprong OG, Tjensvoll K, Heikkilä R, et al. Detection of occult metastases in sentinel lymph nodes from colon cancer patients by K-ras mutation peptide nucleic acid clamp PCR. *Ann Surg* 2010; 251(6):1087-91.
385. Sridhar SS, Hedley D, Siu LL. Raf kinase as a target for anticancer therapeutics. *Mol Cancer Ther* 2005; 4(4):677-85.
386. French AJ, Sargent DJ, Burgart LJ, Foster NR, Kabat BF, Goldberg R, et al. Prognostic significance of defective mismatch repair and BRAF V600E in patients with colon cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14(11):3408-15.
387. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26 (35):5705-12.
388. Lasota J, Kowalik A, Wasag B, Wang ZF, Felisiak-Golabek A, Coates T, et al. Detection of the BRAF V600E Mutation in Colon Carcinoma: Critical Evaluation of the Immunohistochemical Approach. *Am J Surg Pathol* 2014; 38(9):1235-41.
389. Van Cutsem E, Köhne CH, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol* 2011; 29(15):2011-19.

390. Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, Kawasaki T, Meyerhardt JA, Loda M, et al. CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut* 2009; 58(1):90-96.
391. Fariña-Sarasqueta A, Van Lijnschoten G, Moerland E, Creemers GJ, Lemmens VE, Rutten HJ, et al. The BRAF V600E mutation is an independent prognostic factor for survival in stage II and stage III colon cancer patients. *Ann Oncol* 2010; 21(12):2396-2402.
392. Souglakos J, Philips J, Wang R, Marwah S, Silver M, Tzardi M, et al. Prognostic and predictive value of common mutations for treatment response and survival in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009; 101(3):465-72.
393. Zlobec I, Kovac M, Erzberger P, Molinari F, Bihl MP, Rufe A, et al. Combined analysis of specific KRAS mutation, BRAF and microsatellite instability identifies prognostic subgroups of sporadic and hereditary colorectal cancer. *Int J Cancer* 2010; 127(11):2569-75.
394. Pai RK, Jayachandran P, Koong AC, Chang DT, Kwok S, Ma L. BRAF-mutated, microsatellite-stable adenocarcinoma of the proximal colon: an aggressive adenocarcinoma with poor survival, mucinous differentiation, and adverse morphologic features. *Am J Surg Pathol* 2012; 36(5):744-52.
395. Barault L, Charon-Barra C, Jooste V, de la Vega MF, Martin L, Roignot P, et al. Hypermethylator phenotype in sporadic colon cancer: study on a population-based series of 582 cases. *Cancer Res* 2008; 68(20):8541-46.
396. Juo YY, Johnston FM, Zhang DY, Juo HH, Wang H, Pappou EP, et al. Prognostic value of CpG island methylator phenotype among colorectal cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol* 2014; 25 (12):2314-27.
397. Lochhead P, Kuchiba A, Imamura Y, Liao X, Yamauchi M, Nishihara R. Microsatellite instability and BRAF mutation testing in colorectal cancer prognostication. *J Natl Cancer Inst* 2013; 105(15):1151-56.
398. Popovici V, Budinska E, Tejpar S, Weinrich S, Estrella H, Hodgson G, et al. Identification of a poor-prognosis BRAF-mutant-like population of patients with colon cancer. *J Clin Oncol* 2012; 30(12):1288-95.
399. Barrier A, Boelle PY, Roser F, Gregg J, Tse C, Brault D, et al. Stage II colon cancer prognosis prediction by tumor gene expression profiling. *J Clin Oncol* 2006; 24(29):4685-91.
400. Watanabe T, Kobunai T, Sakamoto E, Yamamoto Y, Konishi T, Horiuchi A, et al. Gene expression signature for recurrence in stage III colorectal cancers. *Cancer* 2009; 115(2):283-92.
401. Bandres E, Malumbres R, Cubedo E, Honorato B, Zarate R, Labarga A, et al. A gene signature of 8 genes could identify the risk of recurrence and progression in Dukes' B colon cancer patients. *Oncol Rep* 2007; 17(5):1089-94.
402. Wang Y, Jatko T, Zhang Y, Mutch MG, Talantov D, Jiang J, et al. Gene expression profiles and molecular markers to predict recurrence of Dukes' B colon cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22(9):1564-71.
403. Jiang Y, Casey G, Lavery IC, Zhang Y, Talantov D, Martin-McGreevy M, et al. Development of a clinically feasible molecular assay to predict recurrence of stage II colon cancer. *J Mol Diagn* 2008; 10(4):346-54.
404. Eschrich S, Yang I, Bloom G, Kwong KY, Boulware D, Cantor A, et al. Molecular staging for survival prediction of colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 2005; 23(15):3526-35.
405. Peng J, Wang Z, Chen W, Ding Y, Wang H, Huang H, et al. Integration of genetic signature and TNM staging system for predicting the relapse of locally advanced colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2010; 25(11):1277-85.
406. Garman KS, Acharya CR, Edelman E, Grade M, Gaedcke J, Sud S, et al. A genomic approach to colon cancer risk stratification yields biologic insights into therapeutic opportunities. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(49):19432-37.
407. Vargas T, Moreno-Rubio J, Herranz J, Cejas P, Molina s, González-Vallinas M, et al. ColoLipidGene: signature of lipid metabolism-related genes to predict prognosis in stage-II colon cancer patients. *Oncotarget* 2015 [Epub ahead of print].
408. Smith JJ, Deane NG, Wu F, Merchant NB, Zhang B, Jiang A, et al. Experimentally derived metastasis gene expression profile predicts recurrence and death in patients with colon cancer. *Gastroenterology* 2010; 138(3):958-68.
409. Jorissen RH, Gibbs P, Christie M, Prakash S, Lipton L, Desai J, et al. Metastasis-associated gene expression changes predict poor outcomes in patients with Dukes stage B and C colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15(24):7642-51.
410. Giraldez MD, Lozano JJ, Cuatrecasas M, Alonso-Espinaco V, Maurel J, Mármol M, et al. Gene-expression signature of tumor recurrence in patients with stage II and III colon cancer treated with 5'fluorouracil-based adjuvant chemotherapy. *Int J Cancer* 2013; 132(5):1090-97.
411. Shi M, Beauchamp RD, Zhang B. A network-based gene expression signature informs prognosis and treatment for colorectal cancer patients. *PLoS One* 2012; 7(7):e41292.
412. Van Laar RK. An online gene expression assay for determining adjuvant therapy eligibility in patients with stage 2 or 3 colon cancer. *Br J Cancer* 2010; 103(12):1852-57.
413. Kennedy RD, Bylesjo M, Kerr P, Davison T, Black JM, Kay EW, et al. Development and independent validation of a prognostic assay for stage II colon cancer using formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *J Clin Oncol* 2011; 29(35):4620-26.
414. Lenehan PF, Boardman LA, Riegert-Johnson D, De Petris G, Fry DW, Ohnberger J, et al. Generation and external validation of a tumor-derived 5-gene prognostic signature for recurrence of lymph node-negative, invasive colorectal carcinoma. *Cancer* 2012; 118(21):5234-44.

415. Gray RG, Quirke P, Handley K, Lopatin M, Magill L, Baehner FL, et al. Validation study of a quantitative multigene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for assessment of recurrence risk in patients with stage II colon cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29(35):4611-19.
416. Venook AP, Niedzwiecki D, Lopatin M, Ye X, Lee M, Friedman PN, et al. Biologic determinants of tumor recurrence in stage II colon cancer: validation study of the 12-gene recurrence score in cancer and leukemia group B (CALGB) 9581. *J Clin Oncol* 2013; 31(14):1775-81.
417. Yothers G, O'Connell MJ, Lee M, Lopatin M, Clark-Langone KM, Millward C, et al. Validation of the 12-gene colon cancer recurrence score in NSABP C-07 as a predictor of recurrence in patients with stage II and III colon cancer treated with fluorouracil and leucovorin (FU/LV) and FU/LV plus oxaliplatin. *J Clin Oncol* 2013; 31(36):4512-19.
418. Salazar R, Tabernero J, Moreno V, Nitsche U, Bachleitner-Hofmann T, Lanza G, et al. Validation of a genomic classifier (ColoPrint) for predicting outcome in the T3-MSS subgroup of stage II colon cancer patients. *J Clin Oncol* 2012; 30s (suppl; abstr 3510).
419. Maak M, Simon I, Nitsche U, Roepman P, Snel M, Glas AM, et al. Independent validation of a prognostic genomic signature (ColoPrint) for patients with stage II colon cancer. *Ann Surg* 2013; 257(6):1053-58.
420. Salazar R, Capdevila J, Rosenberg R, Glimelius B, Waard W, Bibeau F, Klaase J, et al. Comparison of ColoPrint risk classification with clinical risk in the prospective PARSC trial. *J Clin Oncol* 2014; 32: 5s (suppl; abstr 3562).
421. Sanz-Pamplona R, Berenguer A, Cordero D, Riccadonna S, Solé X, Crous-Bou M, et al. Clinical value of prognosis gene expression signatures in colorectal cancer: A systematic review. *PLoS One* 2012; 7(11):e48887.
422. Sveen A, Nesbakken A, Ågesen TH, Guren MG, Tveit KM, Skotheim RI, et al. Anticipating the clinical use of prognostic gene expression-based tests for colon cancer stage II and III: is Godot finally arriving? *Clin Cancer Res* 2013; 19(24):6669-77.
423. Marisa L, de Reyniès A, Duval A, Selves J, Gaub MP, Vescovo L, et al. Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med* 2013; 10(5):e1001453.
424. Hu Y, Chen HY, Yu CY, Xu J, Wang JL, Qian J, et al. A long non-coding RNA signature to improve prognosis prediction of colorectal cancer. *Oncotarget* 2014; 5(8):2230-42.
425. Chen H, Xu J, Hong J, Tang R, Zhang X, Fang JY. Long noncoding RNA profiles identify five distinct molecular subtypes of colorectal cancer with clinical relevance. *Mol Oncol* 2014; 8(8):1393-403.
426. Deenen MJ, Cats A, Beijnen JH, Schellens JHM. Clinical pharmacology: pharmacogenetics: opportunities for patient-tailored anticancer therapy. Part 1: Background, methodology, and clinical adoption of pharmacogenetics. *Oncologist* 2011; 16(6):811-19.
427. Wheeler HE, Maitland ML, Dolan ME, Cox NJ, Ratain MJ. Cancer pharmacogenomics: strategies and challenges. *Nat Rev Genet* 2012; 14(1):23-34.
428. Moen EL, Godley LA, Zhang W, Dolan ME. Pharmacogenomics of chemotherapeutic susceptibility and toxicity. *Genome Med* 2012; 30(4): 90.
429. Weng L, Zhang L, Peng Y, Huang RS. Pharmacogenetics and pharmacogenomics: a bridge to individualized cancer therapy. *Pharmacogenomics* 2013; 14(3):315-24.
430. Gillis N, Patei JN, Innocenti F. Clinical implementation of germline cancer pharmacogenetic variants during the Next-Generation Sequencing Era. *Clin Pharmacol Ther* 2014; 95(3):269-80.
431. Wang L, McLeod HL, Weinshilboum RM. Genomics and drug response. *N Engl J Med* 2011; 364(12):1144-53.
432. Zhang W, Zheng Y, Hou L. Pharmacogenomic discovery delineating the genetic basis of drug response. *Curr Genet Med Rep* 2013; 1(3):143-49.
433. Nebert DW. Suggestions for the nomenclature of human alleles: Relevance to ecoetics, pharmacogenetics and molecular epidemiology. *Pharmacogenetics* 2000; 10(4): 279-90.
434. Stranger BE, Forrest MS, Dunning M, Ingle CE, Beazley C, Thorne N, et al. Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. *Science* 2007; 315(5813):848-53.
435. Li W, Olivier M. Current analysis platforms and methods for detecting copy number variation. *Physiol Genomics* 2013; 45(1):1-16.
436. Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danneberg P, Mooren D, Griesbach L, Duschinsky R, et al. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature* 1957; 179(4561):663-66.
437. Arkenau HT, Arnold D, Cassidy J, Diaz-Rubio E, Douillard JY, Hochster H, et al. Efficacy of oxaliplatin plus capecitabine or infusional fluorouracil/leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer: a pooled analysis of randomized trials. *J Clin Oncol* 2008; 26(36):5910-17.
438. Rosmarin D, Palles C, Church D, Domingo E, Jones A, Johnstone E, et al. Genetic markers of toxicity from capecitabine and other fluorouracil-based regimens: Investigation in the QUASAR2 study, systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 2014; 32(10):1031-39.
439. Li J, Bluth MH. Pharmacogenomics of drug metabolizing enzymes and transporters: implications for cancer therapy. *Pharmacogenomics Pers Med* 2011; 4:11-33.
440. Scartozzi M, Maccaroni E, Giampieri R, Pistelli M, Bittoni A, Del Prete M, et al. 5-fluorouracil pharmacogenomics: still rocking after all these years? *Pharmacogenomics* 2011; 12(2):251-65.
441. Yamada H, Iinuma H, Watanabe T. Prognostic value of 5-fluorouracil metabolic enzyme genes in Dukes' stage stage B and C colorectal cancer patients treated with oral 5-fluorouracil based adjuvant chemotherapy. *Oncol Rep* 2008; 19(3):729-35.

442. Taflin H, Wetteergren Y, Odin E, Carlsson G, Derwinger K. Folate Levels and Polymorphisms in the Genes MTHFR, MTR, and TS in Colorectal Cancer. *Clin Med Insights Oncol* 2014; 8:15-20.
443. Shindoh H, Nakano K, Yoshida T, Ishigai M. Comparison of in vitro metabolic conversion of capecitabine to 5-FU in rats, mice, monkeys and humans- toxicological implications. *J Toxicol Sci* 2011; 36(4):411-22.
444. Tabata T, Katoh M, Tokudome S, Hosakawa M, Chiba K, Nakajima M, et al. Bioactivation of capecitabine in human liver: involvement of the cytosolic enzyme on 5'-deoxy-5-fluorocytidine formation. *Drug Metab Dispos* 2004; 32(7):762-67.
445. Panczyk M. Pharmacogenetics research on chemotherapy resistance in colorectal cancer over the last 20 years. *World J Gastroenterol* 2014; 20(29):9775-9827.
446. Mohelnikova-Duchonova B, Melichar B, Soucek P. FOLFOX/FOLFIRI pharmacogenetics: the call for a personalized approach in colorectal cancer therapy. *World J Gastroenterol* 2014; 20(30):10316-30.
447. Lima A, Azevedo R, Sousa H, Seabra V, Medeiros R. Current approaches for TYMS polymorphisms and their importance in molecular epidemiology and pharmacogenetics. *Pharmacogenomics* 2013; 14(11): 1337-51.
448. Formentini A, Henne-Bruns D, Kornmann M. Thymidylate synthase and cyclin D1 protein expression in lymph node negative colorectal cancer: role as prognostic factors? *Hepatogastroenterology* 2012; 59 (118):1859-64.
449. Karlberg M, Öhrling K, Edler D, Hallström M, Ullén H, Ragnhammar P. Prognostic and predictive value of thymidylate synthase expression in primary colorectal cancer. *Anticancer Res* 2010; 30(2):645-51.
450. Qiu LX, Tang QY, Bai JL, Qian XP, Li RT, Liu BR, et al. Predictive value of thymidylate synthase expression in advanced colorectal cancer patients receiving fluoropyrimidine based chemotherapy: evidence from 24 studies. *Int J Cancer* 2008; 123(10): 2384-2389.
451. Lurje G, Manegold PC, Ning Y, Pohl A, Zhang W, et al. Thymidylate synthase gene variations: predictive and prognostic markers. *Mol Cancer Ther* 2009; 8(5):1000-07.
452. Marsh S. Thymidylate synthase pharmacogenetics. *Invest New Drugs* 2005; 23(6):533-37.
453. Mandola MV, Stoecklacher J, Muller-Weeks S et al. A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Cancer Res* 2003; 63(11): 2898-2904.
454. Corre S, Galibert MD. Upstream stimulating factors: highly versatile stress-responsive transcription factors. *Pigment. Cell Res* 2005; 18(5): 337-48.
455. Kawakami K, Watanabe G. Identification and functional analysis of single nucleotide polymorphisms in the tandem repeat sequence of thymidylate synthase gene. *Cancer Res* 2003; 63(18):6004-07.
456. Gusella M, Bolzonella C, Crepaldi G, Ferrazzi E, Padriani R. A novel G/C single-nucleotide polymorphism in the double 28-bp repeat thymidylate synthase allele. *Pharmacogenomics J* 2006; 6(6): 421-24.
457. Pullarkat ST, Stoecklacher J, Ghaderi V, Xiong YP, Ingles SA, Sherrod A, et al. Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *Pharmacogenomics J* 2001; 1(1):65-70.
458. Kawakami K, Omura K, Kanehira E, Watanabe Y. Polymorphic tandem repeats in the thymidylate synthase gene is associated with its protein expression in human gastrointestinal cancers. *Anticancer Res* 1999; 19(4B):146-54.
459. Mauritz R, Giovannetti E, Beumer IJ, Smid K, Van Groeningen CJ, Pinedo HM, et al. Polymorphisms in the enhancer region of the thymidylate synthase gene are associated with thymidylate synthase levels in normal tissues but not in malignant tissues of patients with colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2009; 8(3):146-54.
460. Etienne MC, Chazal M, Laurent-Puig P, Magné N, Rosty C, Formento JL, et al. Prognostic value of tumoral thymidylate synthase and p53 in metastatic colorectal cancer patients receiving fluorouracil-based chemotherapy: phenotypic and genotypic analyses. *J Clin Oncol* 2002; 20(12):2832-43.
461. Morganti M, Ciantelli M, Giglioni B, Putignano AL, Nobili S, Papi L, et al. Relationships between promoter polymorphisms in the thymidylate synthase gene and mRNA levels in colorectal cancers. *Eur J Cancer* 2005; 41(14):2176-83.
462. Iacopetta B, Grieco F, Joseph D, Elsaleh H. A polymorphism in the enhancer region of the thymidylate synthase promoter influences the survival of colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil. *Br J Cancer* 2001; 85(6):827-30.
463. Tsuji T, Hidaka S, Sawai T, Nagaoke T, Yano H, Haseba M, et al. Polymorphism in the thymidylate synthase promoter enhancer region is not an efficacious marker for tumor sensitivity to 5-fluorouracil-based oral adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9(10 Pt 1):3700-04.
464. Suh KW, Kim JH, Yim YB, Jim J, Jeong S. Thymidylate synthase gene polymorphism as a prognostic factor for colon cancer. *J Gastrointest Surg* 2005; 9(3):336-42.
465. Gosens MJ, Moerland E, Lemmens VP, Rutten HT, Tan-Go I, van den Brule AJ. Thymidylate synthase genotyping is more predictive for therapy response than immunohistochemistry in patients with colon cancer. *Int J Cancer* 2008; 123(8): 1941-49.
466. Gusella M, Frigo AC, Bolzonella C, Marinelli R, Barile C, Bononi A, et al. Predictors of survival and toxicity in patients on adjuvant therapy with 5-fluorouracil for colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009; 100(10):1549-57.
467. Hitre E, Budai B, Adleff V, Czeglédi F, Horváth Z, Gyergyay F, et al. Influence of thymidylate synthase gene polymorphisms on the survival of colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil. *Pharmacogenet Genomics* 2005;15(10):723-30.

468. Dotor E, Cuatrecasas M, Martínez-Iniesta M, Navarro M, Vilardell F, Guinó E, et al. Tumor thymidylate synthase 1494del6 genotype as a prognostic factor in colorectal cancer patients receiving fluorouracil-based adjuvant treatment. *J Clin Oncol* 2006; 24(10):1603-11.
469. Fariña-Sarasqueta A, Gosens MJ, Moerland E, van Lijnschoten I, Lemmens VE, Slooter GD, et al. TS gene polymorphisms are not good markers of response to 5-FU therapy in stage III colon cancer patients. *Cell Oncol (Dordr)* 2011; 34(4):327-35.
470. Afzal S, Gusella M, Vainer B, Vogel UB, Andersen JT, Broedbaek K, et al. Combinations of polymorphisms in genes involved in the 5-Fluorouracil metabolism pathway are associated with gastrointestinal toxicity in chemotherapy-treated colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2011; 17(11):3822-29.
471. Afzal S, Gusella M, Jensen SA, Vainer B, Vogel U, Andersen JT, et al. The association of polymorphisms in 5-fluorouracil metabolism genes with outcome in adjuvant treatment of colorectal cancer. *Pharmacogenomics* 2011; 12(9):1257-67.
472. Fernández-Contreras ME, Sánchez-Hernández JJ, González E, Herráez B, Domínguez I, Lozano M, et al. Combination of polymorphisms within 5' and 3' untranslated regions of thymidylate synthase gene modulates survival in 5 fluorouracil-treated colorectal cancer patients. *Int J Oncol* 2009; 34(1):219-29.
473. Fernández-Contreras ME, Sánchez-Hernández JJ, Guijarro M, Gisbert JP, Rivas N, García de Paredes ML, et al. Influence of thymidylate synthase DNA polymorphisms and gender on the clinical evolution of patients with advanced colorectal cancer. *Oncol Rep* 2010; 23(5):1393-400.
474. Rosmarin D, Palles C, Pagnamenta A, Kaur K, Pita G, Martin M, et al. A candidate gene study of capecitabine-related toxicity in colorectal cancer identifies new toxicity variants at DPYD and a putative role for ENOSF1 rather than TYMS. *Gut* 2015; 64 (1):111-20.
475. Sarac SB, Rasmussen CH, Afzal S, Thirstrup S, Jensen SA, Colding-Jørgensen M, et al. Data-driven assessment of the association of polymorphisms in 5-fluorouracil metabolism genes with outcome in adjuvant treatment of colorectal cancer. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2012; 111(3):189-97.
476. Ruzzo A, Graziano F, Galli F, Giacomini E, Floriani I, Galli F, et al. Genetic markers for toxicity of adjuvant oxaliplatin and fluoropyrimidines in the phase III TOSCA trial in high-risk colon cancer patients. *Sci Rep* 2014; 4:6828.
477. Lee KH, Chang HJ, Han SW, Oh DY, Im SA, Bang YJ, et al. Pharmacogenetic analysis of adjuvant FOLFOX for Korean patients with colon cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013; 71(4):843-51.
478. Marcuello E, Altés A, del Rio E, César A, Menoyo A, Baiget M. Single nucleotide polymorphism in the 5' tandem repeat sequences of thymidylate synthase gene predicts for response to fluorouracil-based chemotherapy in advanced colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2004; 112(5):733-37.
479. Park DJ, Stoecklacher J, Zhang W, Tsao-Wei D, Groshen S, Lenz HJ. Thymidylate synthase gene polymorphism predicts response to capecitabine in advanced colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2002; 17(1):46-49.
480. Salgado J, Zabalegui N, Gil C, Monreal I, Rodríguez J, García-Foncillas J. Polymorphisms in the thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase genes predict response and toxicity to capecitabine-raltitrexed in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2007; 17(2):325-28.
481. Martínez-Balibrea E, Abad A, Martínez-Cardús A, Ginés A, Valladares M, Navarro M, et al. UGT1A and TYMS genetic variants predict toxicity and response of colorectal cancer patients treated with first-line irinotecan and fluorouracil combination therapy. *Br J Cancer* 2010; 103(4):581-89.
482. Lecomte T, Ferraz JM, Zinzindohoué F, Lorient MA, Tregouet DA, Landi B, et al. Thymidylate synthase gene polymorphism predicts toxicity in colorectal cancer patients receiving 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2004; 10(17):5880-88.
483. Sharma R, Hoskins JM, Rivory LP, Zucknick M, London R, Liddle C. Thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and toxicity to capecitabine in advanced colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2008; 14(3):817-25.
484. Stoecklacher J, Park DJ, Zhang W, Yang D, Groshen S, Zahedy S, et al. A multivariate analysis of genomic polymorphisms: prediction of clinical outcome to 5-FU/oxaliplatin combination chemotherapy in refractory colorectal cancer. *Br J Cancer* 2004; 91(2):344-54.
485. Ruzzo A, Graziano F, Loupakakis F, Rulli E, Canestrari E, Santini D, et al. Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFOX-4 chemotherapy. *J Clin Oncol* 2007; 25(10):1247-54.
486. Chen J, Hunter DJ, Stampfer MJ, Kyte C, Chan W, Wetmur JG, et al. Polymorphism in the thymidylate synthase promoter enhancer region modifies the risk and survival of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12(10): 958-62.
487. Graziano F, Ruzzo A, Loupakakis F, Santini D, Catalano V, Canestrari E, et al. Liver-only metastatic colorectal cancer patients and thymidylate synthase polymorphisms for predicting response to 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Br J Cancer* 2008; 99(5):716-21.
488. Etienne-Grimaldi MC, Milano G, Maindrault-Goebel F, Chibaudel B, Formento JL, Francoal M, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms and FOLFOX response in colorectal cancer patients. *Br J Clin Pharmacol* 2010; 69(1):58-66.
489. McLeod HL, Sargent DJ, Marsh S, Green EM, King CR, Fuchs CS, et al. Pharmacogenetic predictors of adverse events and response to chemotherapy in metastatic colorectal cancer: results from North American Gastrointestinal Intergroup Trial N9741. *J Clin Oncol* 2010; 28(20):3227-33.

490. Zarate R, Rodríguez J, Bandres E, Patiño-García A, Ponz-Sarvisé M, Viudez A, et al. Oxaliplatin, irinotecan and capecitabine as first-line therapy in metastatic colorectal cancer (mCRC): a dose-finding study and pharmacogenomic analysis. *Br J Cancer* 2010; 102(6):987-94.
491. Glimelius B, Garmo H, Berglund A, Fredriksson LA, Berglund M, Kohnke H et al. Prediction of irinotecan and 5-fluorouracil toxicity and response in patients with advanced colorectal cancer. *Pharmacogenomics J* 2011; 11 (1): 61-71.
492. Martínez-Balibrea E, Abad A, Aranda E, Sastre J, Manzano JL, Díaz-Rubio E, et al. Pharmacogenetic approach for capecitabine or 5-fluorouracil selection to be combined with oxaliplatin as first-line chemotherapy in advanced colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2008; 44(9):1229-37.
493. Boige V, Mendiboure J, Pignon JP, Lorient MA, Castaing M, Barrois M, et al. Pharmacogenetic assessment of toxicity and outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with LV5FU2, FOLFOX, and FOLFIRI: FFCD 2000-05. *J Clin Oncol* 2010; 28(15):2556-64.
494. Braun MS, Richman SD, Thompson L, Daly CL, Meade AM, Adlard JW, et al. Association of molecular markers with toxicity outcomes in a randomized trial of chemotherapy for advanced colorectal cancer: the FOCUS trial. *J Clin Oncol* 2009; 27(33):5519-28.
495. Wang J, Wang X, Zhao M, Choo SP, Ong SJ, Ong SY, et al. Potentially Functional SNPs (pfsnps) as Novel Genomic Predictors of 5-FU Response in Metastatic Colorectal Cancer Patients. *PLoS One* 2014; 9(11): e111694.
496. Kristensen MH, Pedersen PL, Melsen GV, Ellehaug J, Mejer J. Variants in the dihydropyrimidine dehydrogenase, methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase genes predict early toxicity of 5-fluorouracil in colorectal cancer patients. *J Int Med Res* 2010; 38(3):870-83.
497. Jennings BA, Kwok CS, Willis G, Matthews V, Wawruch P, Loke YK. Functional polymorphisms of folate metabolism and response to chemotherapy for colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenet Genomics* 2012; 22(4):290-304.
498. Ulrich CM, Bigler J, Velicer CM, Greene EA, Farin FM, Potter JD. Searching expressed sequence tag databases: discovery and confirmation of a common polymorphism in the thymidylate synthase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Pre* 2000; 9(12):1381-85.
499. Mandola MV, Stoeckelmacher J, Zhang W, Groshen S, Yu MC, Iqbal S, et al. A 6 bp polymorphism in the thymidylate synthase gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels. *Pharmacogenetics* 2004; 14(5):319-27.
500. Etienne MC, Lagrange JL, Dassonville O, Fleming R, Thyss A, Renée N, et al. Population study of dihydropyrimidine dehydrogenase in cancer patients. *J Clin Oncol* 1994; 12(11):2248-53.
501. Ridge SA, Sludden J, Brown O, Robertson L, Wei X, Sapone A, et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase pharmacogenetics in Caucasian subjects. *Br J Clin Pharmacol* 1998; 46(2):151-56.
502. Ofverholm A, Arkblad E, Skrtic S, Albertsson P, Shubbar E, Enerbäck C. Two cases of 5-fluorouracil toxicity linked with gene variants in the DPYD gene. *Clin Biochem* 2010; 43(3):331-34.
503. Amstutz U, Farese S, Aebi S, Largiadèr CR. Hypermethylation of the DPYD promoter region is not a major predictor of severe toxicity in 5-fluorouracil based chemotherapy. *J Exp Clin Cancer Res* 2008; 27:54.
504. Schwab M, Zanger UM, Marx C, Schaeffeler E, Klein K, Dippon J, et al. Role of genetic and nongenetic factors for fluorouracil treatment-related severe toxicity: a prospective clinical trial by the German 5-FU Toxicity Study Group. *J Clin Oncol* 2008; 26(13):2131-38.
505. Papanastasiopoulos P, Stebbing J. Molecular basis of 5-fluorouracil-related toxicity: lessons from clinical practice. *Anticancer Res* 2014; 34(4):1531-34.
506. Wei X, McLeod HL, McMurrough J, Gonzalez FJ, Fernandez-Salguero P. Molecular basis of the human dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and 5-fluorouracil toxicity. *J Clin Invest* 1996; 98(3):610-15.
507. Van Kuilenburg AB, Haasjes J, Richel DJ, Zoetekouw L, Van Lenthe H, De Abreu RA, et al. Clinical implications of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity: identification of new mutations in the DPD gene. *Clin Cancer Res* 2000; 6(12):4705-12.
508. Offer SM, Lee AM, Mattison LK, Fossum C, Wegner NJ, Diasio RB. A DPYD variant (Y186C) in individuals of African ancestry is associated with reduced DPD enzyme activity. *Clin Pharmacol Ther* 2013; 94 (1):158-66.
509. Ma T, Zhu ZG, Ji YB, Zhang Y, Yu YY, Liu BY, et al. Correlation of thymidylate synthase, thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase with sensitivity of gastrointestinal cancer cells to 5-fluorouracil and 5-fluoro-2'-deoxyuridine. *World J Gastroenterol* 2004; 10(2):172-76.
510. Okumura K, Shiomi H, Mekata E, Kaizuka M, Endo Y, Kurumi Y, et al. Correlation between chemosensitivity and mRNA expression level of 5-fluorouracil-related metabolic enzymes during liver metastasis of colorectal cancer. *Oncol Rep* 2006; 15(4):875-82.
511. Offer SM, Fossum CC, Wegner NJ, Stuflesser AJ, Butterfield GL, Diasio RB. Comparative functional analysis of DPYD variants of potential clinical relevance to dihydropyrimidine dehydrogenase activity. *Cancer Res* 2014; 74(9):2545-54.
512. Offer SM, Wegner NJ, Fossum C, Wang K, Diasio RB. Phenotypic profiling of DPYD variations relevant to 5-fluorouracil sensitivity using real-time cellular analysis and in vitro measurement of enzyme activity. *Cancer Res* 2013; 73(6):1958-68.

513. Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, Metzger R, Groshen S, Tsao-Wei DD, et al. Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. *Clin Cancer Res* 2000; 6(4):1322-27.
514. Vallböhmer D, Yang DY, Kuramochi H, Shimizu D, Danenberg KD, Lindebjerg J, et al. DPD is a molecular determinant of capecitabine efficacy in colorectal cancer. *Int J Oncol* 2007; 31(2):413-18.
515. Ciaparrone M, Quirino M, Schinzari G, Zannoni G, Corsi DC, Vecchio FM, et al. Predictive role of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase expression in colorectal cancer patients receiving 5-fluorouracil. *Oncology* 2006; 70(5):366-77.
516. Akagi Y, Kinugasa T, Mizobe, Kawahara A, Kage M, Shirouzu K. Expression of dihydropyrimidine dehydrogenase, orotate phosphoribosyl transferase and thymidylate synthase in patients with primary colorectal cancer, and associations with site of first metastasis. *Anticancer Res* 2012; 32(6):2277-82.
517. Soong R, Shah N, Salto-Tellez M, Tai BC, Soo RA, Han HC, et al. Prognostic significance of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase protein expression in colorectal cancer patients treated with or without 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Ann Oncol* 2008; 19(5):915-19.
518. Lassmann S, Hennig M, Rosenberg R, Nährig J, Schreglmann J, Krause F, et al. Thymidine phosphorylase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase mRNA expression in primary colorectal tumors-correlation to tumor histopathology and clinical follow-up. *Int J Colorectal Dis* 2006; 21(3):238-47.
519. Kornmann M, Schawabe W, Sander S, Kron , Sträter J, Polat S, et al. Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA expression levels: predictors for survival in colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 2003; 9(11):4116-24.
520. Ishikawa M, Miyauchi T, Kashiwagi Y. Clinical implications of thymidylate synthetase, dihydropyrimidine dehydrogenase and orotate phosphoribosyl transferase activity levels in colorectal carcinoma following radical resection and administration of adjuvant 5-FU chemotherapy. *BMC Cancer* 2008; 8:188.
521. Ochiai T, Hishimura K, Noguchi H, Kitajima M, Tsuruoka Y, Takahashi Y, et al. Prognostic impact of orotate phosphoribosyl transferase among 5-fluorouracil metabolic enzymes in resectable colorectal cancers treated by oral 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy. *Int J Cancer* 2006; 118(12):3084-88.
522. Westra JL, Hollema H, Schaapveld M, et al. Predictive value of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase protein expression on survival in adjuvantly treated stage colon cancer patients. *Ann Oncol* 2005; 16(10):1646-53.
523. Meropol NJ, Gold PJ, Diasio RB, Andria M, Dhami M, Godfrey T, et al. Thymidine phosphorylase expression is associated with response to capecitabine plus irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24(25):4069-77.
524. Morel A, Boisdron-Celle M, Fey L, Soulie P, Craipeau MC, Traore S, et al. Clinical relevance of different dihydropyrimidine dehydrogenase gene single nucleotide polymorphisms on 5-fluorouracil tolerance. *Mol Cancer Ther* 2006; 5(11):2895-904.
525. Deenen MJ, Tol J, Burylo AM, Doodeman VD, de Boer A, Vincent A, et al. Relationship between single nucleotide polymorphisms and haplotypes in DPYD and toxicity and efficacy of capecitabine in advanced colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17(10):3455-68.
526. Madi A, Fisher D, Maughan T, Colley J, Meade AM, Maynard J, et al. Comprehensive pharmacogenetic profiling of advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2013 (suppl; abstr 3509).
527. Gross E, Busse B, Riemenschneider M, Neubauer S, Seck K, Klein HG, et al. Strong association of a common dihydropyrimidine dehydrogenase gene polymorphism with fluoropyrimidine-related toxicity in cancer patients. *PLoS One* 2008; 3(12):e4003.
528. Van Kuilenburg AB, Haasjes J, Richel DJ, Zoetekouw L, Van Lenthe H, De Abreu RA, et al. Clinical implications of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity: identification of new mutations in the DPD gene. *Clin Cancer Res* 2000; 6(12):4705-12.
529. Saif MW. Dihydropyrimidine dehydrogenase gene (DPYD) polymorphism among Caucasian and non-Caucasian patients with 5-FU- and capecitabine-related toxicity using full sequencing of DPYD. *Cancer Genomics Proteomics* 2013; 10(2):89-92.
530. Loganayagam A, Arenas-Hernandez M, Fairbanks L, Ross P, Sanderson JD, Marinaki AM. The contribution of deleterious DPYD gene sequence variants to fluoropyrimidine toxicity in British cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 65(2):403-06.
531. He YF, Wei W, Zhang X, Li YH, Li S, Wang FH, et al. Analysis of the DPYD gene implicated in 5-fluorouracil catabolism in Chinese cancer patients. *J Clin Pharm Ther* 2008; 33(3):307-14.
532. Boisdron-Celle M, Remaud G, Traore S, Poirier AL, Gamelin L, Morel A, et al. 5-Fluorouracil-related severe toxicity: a comparison of different methods for the pretherapeutic detection of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Cancer Lett* 2007; 249(2):271-82.
533. Magnani E, Farnetti E, Nicoli D, Casali B, Savoldi L, Focaccetti C, et al. Fluoropyrimidine toxicity in patients with dihydropyrimidine dehydrogenase splice site variant: the need for further revision of dose and schedule. *Intern Emerg Med* 2013; 8(5):417-23.
534. Capitain O, Boisdron-Celle M, Poirier AL, Abadie-Lacourtoisie S, Morel A, Gamelin E. The influence of fluorouracil outcome parameters on tolerance and efficacy in patients with advanced colorectal cancer. *Pharmacogenomics J* 2008; 8(4):256-67.

535. Sulzyc-Bielicka V, Bińczak-Kuleta A, Pioch W, Kładny J, Gziut K, Bielicki D, et al. 5-Fluorouracil toxicity-attributable IVS14 + 1G > A mutation of the dihydropyrimidine dehydrogenase gene in Polish colorectal cancer patients. *Pharmacol Rep* 2008; 60 (2):238-42.
536. Kleibl Z, Fidlerova J, Kleiblova P, Kormunda S, Bilek M, Bouskova K, et al. Influence of dihydropyrimidine dehydrogenase gene (DPYD) coding sequence variants on the development of fluoropyrimidine-related toxicity in patients with high-grade toxicity and patients with excellent tolerance of fluoropyrimidine-based chemotherapy. *Neoplasma* 2009; 56 (4):303-316.
537. Cellier P, Leduc B, Martin L, Vié B, Chevelle C, Vendrely V, et al. Phase II study of preoperative radiation plus concurrent daily tegafur-uracil (UFT) with leucovorin for locally advanced rectal cancer. *BMC Cancer* 2011; 11:98.
538. Van Kuilenburg AB, Muller EW, Haasjes J, Meinsma R, Zoetekouw L, Waterham HR, et al. Lethal outcome of a patient with a complete dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency after administration of 5-fluorouracil: frequency of the common IVS14+1G>A mutation causing DPD deficiency. *Clin Cancer Res* 2011; 7(5):1149-53.
539. Maring JG, van Kuilenburg AB, Haasjes J, Piersma H, Groen HJ, Uges DR, et al. Reduced 5-FU clearance in a patient with low DPD activity due to heterozygosity for a mutant allele of the DPYD gene. *Br J Cancer* 2002; 86(7):1028-33.
540. Terrazzino S, Cargnin S, Del Re M, Danesi R, Canonico PL, Genazzani AA. DPYD IVS14+1G>A and 2846A>T genotyping for the prediction of severe fluoropyrimidine-related toxicity: a meta-analysis. *Pharmacogenomics* 2013; 14(11):1255-72.
541. Swen JJ, Nijenhuis M, de Boer A, Grandia L, Maitland-van der Zee AH, Mulder H, et al. Pharmacogenetics: from bench to byte--an update of guidelines. *Clin Pharmacol Ther* 2011; 89(5):662-73.
542. Caudle KE, Thorn CF, Klein TE, Swen JJ, McLeod HL, Diasio RB, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for dihydropyrimidine dehydrogenase genotype and fluoropyrimidine dosing. *Clin Pharmacol Ther* 2013; 94(6):640-45.
543. Gamelin E, Delva R, Jacob J, Marrouche Y, Raoul JL, Pezet D, et al. Individual fluorouracil dose adjustment based on pharmacokinetic follow-up compared with conventional dosage: results of a multicenter randomized trial of patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26(13):2099-2105.
544. Lee AM, Shi Q, Pavay E, Alberts SR, Sargent DJ, Sinicrope FA, et al. DPYD variants as predictors of 5-fluorouracil toxicity in adjuvant colon cancer treatment (NCCTG N0147). *J Natl Cancer Inst* 2014; 106 (12).
545. Magné N, Etienne-Grimaldi MC, Cals L, Renée N, Formento JL, Francoual M, et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and the IVS14+1G>A mutation in patients developing 5FU-related toxicity. *Br J Clin Pharmacol* 2007; 64(2):237-40.
546. Fariña-Sarasqueta A, van Lijnschoten G, Rutten HJ, van den Brule AJ. Value of gene polymorphisms as markers of 5-FU therapy response in stage III colon carcinoma: a pilot study. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 66(6):1167-71.
547. Mueller F, Büchel B, Köberle D, Schürch S, Pfister B, Krähenbühl S. Gender-specific elimination of continuous-infusional 5-fluorouracil in patients with gastrointestinal malignancies: results from a prospective population pharmacokinetic study. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013; 71(2):361-70.
548. Afzal S, Jensen SA, Vainer B, Vogel U, Matsen JP, Sørensen JB, et al. MTHFR polymorphisms and 5-FU-based adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Ann Oncol* 2009; 20(10):1660-66.
549. Bagley PJ, Selhub J. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(22):13217-20.
550. Inoue S, Hashiguchi M, Chiyoda T, Sunami Y, Tanaka T, Mochizuki M. Pharmacogenetic study of methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase in Japanese and assessment of ethnic and gender differences. *Pharmacogenomics* 2007; 8(1):41-7.
551. Sohn KJ, Croxford R, Yates Z, Lucock M, Kim YI. Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism on chemosensitivity of colon and breast cancer cells to 5-fluorouracil and methotrexate. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(2):134-44.
552. Etienne MC, Ilc K, Formento JL, Laurent-Puig P, Formento P, Cheradame S, et al. Thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: relationships with 5-fluorouracil sensitivity. *Br J Cancer* 2004; 90(2):526-34.
553. Cohen V, Panet-Raymond V, Sabbaghian N, Morin I, Batist G, Rozen R. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in advanced colorectal cancer: a novel genomic predictor of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2003; 9(5):1611-14.
554. Derwinger K, Wettergren Y, Odin E, Carlsson G, Gustavsson B. A study of the MTHFR gene polymorphism C677T in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2009; 8(1):43-48.
555. Chua W, Goldstein D, Lee CK, Dhillon H, Michael M, Mitchell P, et al. Molecular markers of response and toxicity to FOLFOX chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009; 101(6):998-1004.
556. Zintzaras E, Ziogas DC, Kitsios GD, Papathanasiou AA, Lau J, Raman G. MTHFR gene polymorphisms and response to chemotherapy in colorectal cancer: a meta-analysis. *Pharmacogenomics* 2009; 10(8):1285-94.
557. Etienne MC, Formento JL, Chazal M, Francoual M, Magné N, Formento P, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and response to fluorouracil-based treatment in advanced colorectal cancer patients. *Pharmacogenetics* 2004; 14(12):785-92.

558. Marcuello E, Altés A, Menoyo A, Rio ED, Baiget M. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: genomic predictors of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy? *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 57(6):835-40.
559. Paré L, Salazar J, del Rio E, Baiget M, Altés A, Marcuello E, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: genomic predictors of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy in females. *J Clin Oncol* 2008; 26(20):3468.
560. Jakobsen A, Nielsen JN, Gyldenkerne N, Lindeberg J. Thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in normal tissue as predictors of fluorouracil sensitivity. *J Clin Oncol* 2005; 23(7):1365-69.
561. Ruzzo A, Graziano F, Loupakis F, Santini D, Catalano V, Bissoni R, et al. Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFIRI chemotherapy. *Pharmacogenomics J* 2008; 8(4):278 - 88.
562. Suh KW, Kim JH, Kimdo Y, Kim YB, Lee C, Choi S. Which gene is a dominant predictor of response during FOLFOX chemotherapy for the treatment of metastatic colorectal cancer, the MTHFR or XRCC1 gene? *Ann Surg Oncol* 2006; 13(11): 1379-85.
563. Taflin H, Wettergren Y, Odin E, Carisson G, Derwinger K. Gene polymorphisms MTHFR C677T and MTR A2756G as predictive factors in adjuvant chemotherapy for stage III colorectal cancer. *Anticancer Res* 2011; 31(9):3057-62.
564. Zhu L, Wang F, Hu F, Wang Y, Li D, Dong X, et al. Association between MTHFR polymorphisms and overall survival of colorectal cancer patients in Northeast China. *Med Oncol* 2013; 30(1):467.
565. Fernández-Peralta AM, Daimiel L, Nejda N, Iglesias D, Medina Arana V, González-Aguilera JJ. Association of polymorphisms MTHFR C677T and A1298C with risk of colorectal cancer, genetic and epigenetic characteristic of tumors, and response to chemotherapy. *Int J Colorectal Dis* 2010; 25(2):141-51.
566. Delgado-Plasencia L, Medina-Arana V, Bravo-Gutiérrez A, Pérez-Palma J, Álvarez-Argüelles H, Salido-Ruiz E, et al. Impact of the MTHFR C677T polymorphism on colorectal cancer in a population with low genetic variability. *Int J Colorectal Dis* 2013; 28(9):1187-93.
567. Zhao J, Li W, Zhu D, Yu Q, Zhang Z, Sun M et al. Association of single nucleotide polymorphisms in MTHFR and ABCG2 with the different efficacy of first-line chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *Med Oncol* 2014; 31(1):802.
568. Zhang W, Press OA, Haiman CA, Yang DY, Gordon MA, Fazzone W, et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and sex-specific survival in patients with metastatic colon cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25(24): 3726-31.
569. Van Huis-Tanja LH, Gelderblom H, Punt CJ, Guchelaar HJ. MTHFR polymorphisms and capecitabine-induced toxicity in patients with metastatic colorectal cancer. *Pharmacogenet Genomics* 2013; 23(4): 208-18.
570. Custodio A, Moreno-Rubio J, Aparicio J, Gallego-Plazas J, Yaya R, Maurel J, et al. Pharmacogenetic predictors of outcome in patients with stage II and III colon cancer treated with oxaliplatin and fluoropyrimidine-based adjuvant chemotherapy. *Mol Cancer Ther* 2014; 13 (9):2226-37.
571. Cecchin E, Perrone G, Nobili S, Polesel J, De Mattia E, Zanusso C, et al. MTHFR-1298 A>C (rs1801131) is a predictor of survival in two cohorts of stage II/III colorectal cancer patients treated with adjuvant fluoropyrimidine chemotherapy with or without oxaliplatin. *Pharmacogenomics J* 2014 [Epub ahead of print].
572. Weisberg I, Tran P, Christensen B et al. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998; 64(3):169-72.
573. Ulvik A, Ueland PM, Fredriksen A, Meyer K, Vollset SE, Hoff G, et al. Functional inference of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C > T and 1298A > C polymorphisms from a large-scale epidemiological study. *Hum Genet* 2007; 121(1):57-64.
574. Ogino S, Wilson RB. Genotype and haplotype distributions of MTHFR677C > T and 1298A > C single nucleotide polymorphisms: a meta-analysis. *J Hum Genet* 2003; 48 (1):1-7.
575. Bottinger AK, Hurtig-Wennlof A, Sjöström M, Yngve A, Nilsson TK. Association of total plasma homocysteine with methylenetetrahydrofolate reductase genotypes 677C>T, 1298A > C, and 1793G > A and the corresponding haplotypes in Swedish children and adolescents. *Int J Mol Med* 2007; 19(4):659-65.
576. Evans DR, Guy HI. Mammalian pyrimidine biosynthesis: fresh insights into an ancient pathway. *J Biol Chem*. 2004; 279(32):33035-38.
577. Muhale FA, Wetmore BA, Thomas RS, McLeod HL. Systems pharmacology assessment of the 5-fluorouracil pathway. *Pharmacogenomics* 2011; 12(3):341-50.
578. Tokunaga Y, Sasaki H, Saito T. Clinical role of orotate phosphoribosyl transferase and dihydropyrimidine dehydrogenase in colorectal cancer treated with postoperative fluoropyrimidine. *Surgery* 2007; 141(3):346-53.
579. Tokunaga Y, Ohnishi T, Sasaki H. [Investigation of chemotherapy based on enzyme expression and drug sensitivity test in colorectal cancer]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2011; 38(1):69-73.
580. Ichikawa W, Uetake H, Shirota Y, Yamada H, Takahashi T, Nihei Z, et al. Both gene expression for orotate phosphoribosyltransferase and its ratio to dihydropyrimidine dehydrogenase influence outcome following fluoropyrimidine-based chemotherapy for metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2003; 89(8):1486-92.
581. Ochiai T, Nishimura K, Noguchi H, Kitajima M, Tsuruoka Y, Takahashi Y, et al. Prognostic impact of orotate phosphoribosyl transferase activity in resectable colorectal cancers treated by 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy. *J Surg Oncol* 2006; 94(1):45-50.

582. Koopman M, Venderbosch S, van Tinteren H, Ligtenberg MJ, Nagtegaal I, Van Krieken JH, et al. Predictive and prognostic markers for the outcome of chemotherapy in advanced colorectal cancer, a retrospective analysis of the phase III randomised CAIRO study. *Eur J Cancer* 2009; 45(11):1999-2006.
583. Kitajima M, Takita N, Hata M, Maeda T, Sakamoto K, Kamano T, et al. The relationship between 5-fluorouracil sensitivity and single nucleotide polymorphisms of the orotate phosphoribosyl transferase gene in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2006; 15(1):161-65.
584. Ichikawa W, Takahashi T, Suto K, Sasaki Y, Hirayama R. Orotate phosphoribosyltransferase gene polymorphism predicts toxicity in patients treated with bolus 5-fluorouracil regimen. *Clin Cancer Res* 2006; 12(13):3928-34.
585. Tsunoda A, Nakao K, Watanabe M, Matsui N, Ooyama A, Kusano M. Associations of various gene polymorphisms with toxicity in colorectal cancer patients receiving oral uracil and tegafur plus leucovorin: a prospective study. *Ann Oncol* 2011; 22(2):355-61.
586. Gusella M, Bertolaso L, Bolzonella C, Pasini F, Padriani R. Frequency of uridine monophosphate synthase Gly(213)Ala polymorphism in Caucasian gastrointestinal cancer patients and healthy subjects, investigated by means of new, rapid genotyping assays. *Genet Test Mol Biomarkers* 2011; 15(10):691-95.
587. Suchi M, Mizuno H, Kawai Y, Tsuboi T, Sumi S, Okajima K, et al. Molecular cloning of the human UMP synthase gene and characterization of point mutations in two hereditary orotic aciduria families. *Am J Hum Genet* 1997; 60(3):525-39.
588. Houghton JA, Houghton PJ, Wooten RS. Mechanism of induction of gastrointestinal toxicity in the mouse by 5-fluorouracil, 5-fluorouridine, and 5-fluoro-2'-deoxyuridine. *Cancer Res* 1979; 39(7 Pt 1):2406-13.
589. Graham J, Mushin M, Kirkpatrick P. Oxaliplatin. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3(1):11-12.
590. Zhang S, Lovejoy KS, Shima JE, Lagpacan LL, Shu Y, Lapuk A, et al. Organic cation transporters are determinants of oxaliplatin cytotoxicity. *Cancer Res* 2006; 66(17):8847-57.
591. Sprowl JA, Ciarimboli G, Lancaster CS, Giovino H, Gibson AA, Du G, et al. Oxaliplatin-induced neurotoxicity is dependent on the organic cation transporter OCT2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(27):11199-204.
592. Jong NN, Nakanishi T, Liu JJ, Tamai I, McKeage MJ. Oxaliplatin transport mediated by organic cation/carnitine transporters OCTN1 and OCTN2 in overexpressing human embryonic kidney 293 cells and rat dorsal root ganglion neurons. *J Pharmacol Exp* 2011; 338(2):537-47.
593. Liu JJ, Lu J, McKeage MJ. Membrane transporters as determinants of the pharmacology of platinum anticancer drugs. *Curr Cancer Drug Targets* 2012; 12(8):962-86.
594. Di Pietro G, Magno LA, Rios-Santos F. Glutathione S-transferases: an overview in cancer research. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2010; 6(2):153-70.
595. Ruzza P, Rosato A, Rossi CR, Floreani M, Quintieri L. Glutathione transferases as targets for cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2009; 9(7):763-77.
596. Ahmad S. Platinum-DNA interactions and subsequent cellular processes controlling sensitivity to anticancer platinum complexes. *Chem Biodivers* 2010; 7(3):543-66.
597. Chaney SG, Campbell SL, Bassett E, Wu Y. Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 53(1):3-11.
598. Marsh S, McLeod H, Dolan E, Shukla SJ, Rabik CA, Gong L, et al. Platinum pathway. *Pharmacogenetic Genomics* 2009; 19(7):563-64.
599. Bohanes P, Labonte MJ, Lenz HJ. A review of excision repair cross-complementation group 1 in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2011; 10(3):157-64.
600. McNeil EM, Melton DW. DNA repair endonuclease ERCC1-XPF as a novel therapeutic target to overcome chemoresistance in cancer therapy. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(20):9990-10004.
601. Uchida K, Danenberg PV, Danenberg KD, Grem JL. Thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase, ERCC1, and thymidine phosphorylase gene expression in primary and metastatic gastrointestinal adenocarcinoma tissue in patients treated on a phase I trial of oxaliplatin and capecitabine. *BMC Cancer* 2008; 8:386.
602. Grimminger PP, Shi M, Barrett C, Lebowitz D, Danenberg KD, Brabender J, et al. TS and ERCC-1 mRNA expressions and clinical outcome in patients with metastatic colon cancer in CONFIRM-1 and -2 clinical trials. *Pharmacogenomics J* 2012; 12(5):404-11.
603. Noda E, Maeda K, Inoue T, Fukunaga S, Nagahara H, Shibutani M, et al. Predictive value of expression of ERCC1 and GST-p for 5-fluorouracil/oxaliplatin chemotherapy in advanced colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2012; 59(113):130-33.
604. Huang MY, Tsai HL, Lin CH, Huang CW, Ma CJ, Huang CM, et al. Predictive value of ERCC1, ERCC2, and XRCC1 overexpression for stage III colorectal cancer patients receiving FOLFOX-4 adjuvant chemotherapy. *J Surg Oncol* 2013; 108(7):457-64.
605. Li P, Fang YJ, Li F, Ou QJ, Chen G, Ma G. ERCC1, defective mismatch repair status as predictive biomarkers of survival for stage III colon cancer patients receiving oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy. *Br J Cancer* 2013; 108(6):1238-44.
606. Yu JJ, Mu C, Lee KB, Okamoto A, Reed EL, Bostick-Bruton F, et al. A nucleotide polymorphism in ERCC1 in human ovarian cancer cell lines and tumor tissues. *Mutat Res* 1997; 382(1-2):13-20.
607. Viguier J, Boige V, Miquel C, Pocard M, Giraudeau B, Sabourin JC, et al. ERCC1 codon 118 polymorphism is a predictive factor for the tumor response to oxaliplatin/5-fluorouracil combination chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(17):6212-17.

608. Chai H, Pan J, Zhang X, Zhang X, Shen X, Li H, et al. ERCC1 C118T associates with response to FOLFOX4 chemotherapy in colorectal cancer patients in Han Chinese. *Int J Clin Exp Med* 2012; 5(2):186-94.
609. Chang PM, Tzeng CH, Chen PM, Lin JK, Lin TC, Chen WS, et al. ERCC1 codon 118 C→T polymorphism associated with ERCC1 expression and outcome of FOLFOX-4 treatment in Asian patients with metastatic colorectal carcinoma. *Cancer Sci* 2009; 100(2):278-83.
610. Li HY, Ge X, Huang GM, Li KY, Zhao JQ, Yu XM, et al. GSTP1, ERCC1 and ERCC2 polymorphisms, expression and clinical outcome of oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy in colorectal cancer in Chinese population. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13(7):3465-69.
611. Huang MY, Huang ML, Chen MJ, Lu CY, Chen CF, Tsai PC, et al. Multiple genetic polymorphisms in the prediction of clinical outcome of metastatic colorectal cancer patients treated with first-line FOLFOX-4 chemotherapy. *Pharmacogenet Genomics* 2011; 21(1):18-25.
612. Paré L, Marcuello E, Altés A, del Río E, Sedano L, Salazar J, et al. Pharmacogenetic prediction of clinical outcome in advanced colorectal cancer patients receiving oxaliplatin/5-fluorouracil as first-line chemotherapy. *Br J Cancer* 2008; 99(7):1050-55.
613. Liang J, Jiang T, Yao RY, Liu ZM, Lv HY, Qi WW. The combination of ERCC1 and XRCC1 gene polymorphisms better predicts clinical outcome to oxaliplatin-based chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 66(3):493-500.
614. Spindler KL, Andersen RF, Jensen LH, Ploen J, Jakobsen A. EGF61A>G polymorphism as predictive marker of clinical outcome to first-line capecitabine and oxaliplatin in metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2010; 21(3):535-39.
615. Chen YC, Tzeng CH, Chen PM, Lin JK, Lin TC, Chen WS, et al. Influence of GSTP1 I105V polymorphism on cumulative neuropathy and outcome of FOLFOX-4 treatment in Asian patients with colorectal carcinoma. *Cancer Sci* 2010; 101(2):530-35.
616. Kumamoto K, Ishibashi K, Okada N, Tajima Y, Kuwabara K, Kumagai Y, et al. Polymorphisms of GSTP1, ERCC2 and TS-3'UTR are associated with the clinical outcome of mFOLFOX6 in colorectal cancer patients. *Oncol Lett* 2013; 6(3):648-54.
617. Nishina T, Takano Y, Denda T, Yasui H, Takeda K, Ura T, et al. A phase II clinical study of mFOLFOX6 plus bevacizumab as first-line therapy for Japanese advanced/recurrent colorectal cancer patients. *Jpn J Clin Oncol* 2013; 43(11):1080-86.
618. Lamas MJ, Duran G, Balboa E, Bernardez B, Touris M, Vidal Y, et al. Use of a comprehensive panel of biomarkers to predict response to a fluorouracil-oxaliplatin regimen in patients with metastatic colorectal cancer. *Pharmacogenomics* 2011; 12(3):433-42.
619. Moreno V, Gemignani F, Landi S, Gioia-Patricola L, Chabrier A, Blanco I, et al. Polymorphisms in genes of nucleotide and base excision repair: risk and prognosis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12 (7 Pt 1): 2101-08.
620. Park DJ, Zhang W, Stoecklacher J, Tsao-Wei D, Groshen S, Gil J, et al. ERCC1 gene polymorphism as a predictor for clinical outcome in advanced colorectal cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Clin Adv Hematol Oncol* 2003; 1(3):162-66.
621. Di Francia R, Siesto RS, Valente D, Del Buono A, Pugliese S, Cecere S, et al. Current strategies to minimize toxicity of oxaliplatin: selection of pharmacogenomic panel tests. *Anticancer Drugs* 2013; 24(10): 1069-78.
622. Cortejoso L, García MI, García-Alfonso P, González-Haba E, Escolar F, Sanjurjo M, López-Fernández LA. Differential toxicity biomarkers for irinotecan- and oxaliplatin-containing chemotherapy in colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013; 71(6):1463-72.
623. Inada M, Sato M, Morita S, Kitagawa K, Kawada K, Mitsuma A, et al. Associations between oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and polymorphisms of the ERCC1 and GSTP1 genes. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2010; 48(11):729-34.
624. Oguri T, Mitsuma A, Inada-Inoue M, Morita S, Shibata T, Shimokata T, et al. Genetic polymorphisms associated with oxaliplatin-induced peripheral neurotoxicity in Japanese patients with colorectal cancer. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2013; 51(6):475-81.
625. Yin M, Yan J, Martinez-Balibrea E, Graziano F, Lenz HJ, Kim HJ, et al. ERCC1 and ERCC2 polymorphisms predict clinical outcomes of oxaliplatin-based chemotherapies in gastric and colorectal cancer: a systemic review and meta-analysis. *Clin Cancer Res* 2011; 17 (6):1632-40.
626. Lu X, Xiao S, Jin C, van der Straaten T, Li X. ERCC1 and XPD/ERCC2 polymorphisms' predictive value of oxaliplatin-based chemotherapies in advanced colorectal cancer ha an ethnic discrepancy: a meta-analysis. *J Clin Lab Anal* 2012; 26(19):10-15.
627. Qian YY, Liu XY, Wu Q, Song X, Chen XF, Liu YQ, et al. The ERCC1 C118T polymorphism predicts clinical outcomes of colorectal cancer patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy: a meta-analysis based on 22 studies. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15(19): 8383-90.
628. Lunn RM, Helzlsouer KJ, Parshad R, Umbach DM, Harris EL, Sanford KK, et al. XPD polymorphisms: effects on DNA repair proficiency. *Carcinogenesis* 2000; 21(4):551-55.
629. Qiao Y, Spitz MR, Shen H, Guo Z, Shete S, Hedayat M, et al. Modulation of repair of ultraviolet damage in the host-cell reactivation assay by polymorphic XPC and XPD/ERCC2 genotypes. *Carcinogenesis* 2002; 23(2):295-99.

630. Braun MS, Richman SD, Quirke P, Daly C, Adlard JW, Elliott F, et al. Predictive biomarkers of chemotherapy efficacy in colorectal cancer: results from the UK MRC FOCUS trial. *J Clin Oncol* 2008; 26(16):2690-98.
631. Lai JJ, Tzeng CH, Chen PM, Lin JK, Lin TC, Chen WS, et al. Very low prevalence of XPD K751Q polymorphism and its association with XPD expression and outcomes of FOLFOX-4 treatment in Asian patients with colorectal carcinoma. *Cancer Sci* 2009; 100(7):1261-66.
632. Le Morvan V, Smith D, Laurand A, Brouste V, Bellott R, Soubeyran I, et al. Determination of ERCC2 Lys751Gln and GSTP1 Ile105Val gene polymorphisms in colorectal cancer patients: relationships with treatment outcome. *Pharmacogenomics* 2007; 8(12):1693-1703.
633. Park DJ, Stoecklacher J, Zhang W, Tsao-Wei DD, Groshen S, Lenz HJ. A Xeroderma pigmentosum group D gene polymorphism predicts clinical outcome to platinum-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Res* 2001; 61(24):8654-58.
634. Lai CY, Hsieh LL, Sung FC, Tang R, Bai CH, Wu FY, et al. Tumor site- and stage-specific associations between allelic variants of glutathione S-transferase and DNA-repair genes and overall survival in colorectal cancer patients receiving 5-fluorouracil-based chemotherapy. *PLoS One* 2013; 8(7):e69039.
635. Qian YY, Liu XY, Pei D, Xu JL, Shen H, Chen XF, et al. The XPD Lys751Gln Polymorphism has Predictive Value in Colorectal Cancer Patients Receiving Oxaliplatin-Based Chemotherapy: a Systemic Review and Meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15(22):9699-9706.
636. Gan Y, Li XR, Chen DJ, Wu JH. Association between polymorphisms of XRCC1 Arg399Gln and XPD Lys751Gln genes and prognosis of colorectal cancer in a Chinese population. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13 (11):5721-24.
637. Monzo M, Moreno I, Navarro A, Ibeas R, Artells R, Gel B, et al. Single nucleotide polymorphisms in nucleotide excision repair genes XPA, XPD, XPG and ERCC1 in advanced colorectal cancer patients treated with first-line oxaliplatin/fluoropyrimidine. *Oncology* 2007; 72 (5-6):364-70.
638. Dunand-Sauthier I, Hohl M, Thorel F, Jaquier-Gubler P, Clarkson SG, Scharer OD. The spacer region of XPG mediates recruitment to nucleotide excision repair complexes and determines substrate specificity. *J Biol Chem* 2005; 280(8):7030-737.
639. Chen J, Xie F, Chen K, Wang D, Jiang H, Li J, et al. ERCC5 promoter polymorphisms at -763 and +25 predict the response to oxaliplatin-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* 2009; 8(14):1424-30.
640. Liu D, Wu HZ, Zhang YN, Kang H, Sun MJ, Wang EH, et al. DNA repair genes XPC, XPG polymorphisms: relation to the risk of colorectal carcinoma and therapeutic outcome with oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy. *Mol Carcinog* 2012; 51 Suppl 1:E83-93.
641. Sun K, Gong A, Liang P. Predictive impact of genetic polymorphisms in DNA repair genes on susceptibility and therapeutic outcomes to colorectal cancer patients. *Tumour Biol* 2014 [Epub ahead of print].
642. Negandhi AA, Hyde A, Dicks E, Pollett W, Youngusband BH, Parfrey P, et al. MTHFR Glu429Ala and ERCC5 His46His polymorphisms are associated with prognosis in colorectal cancer patients: analysis of two independent cohorts from Newfoundland. *PLoS One* 2013; 8(4):e61469.
643. Troelstra C, van Gool A, de Wit J, Vermeulen W, Bootsma D, Hoeijmakers JH. ERCC6, a member of a subfamily of putative helicases, is involved in Cockayne's syndrome and preferential repair of active genes. *Cell* 1992; 71(6):939-53.
644. Liu JW, He CY, Sun LP, Xu Q, Xing CZ, Yuan Y, et al. The DNA repair gene ERCC6 rs1917799 polymorphism is associated with gastric cancer risk in Chinese. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14(10):6103-08.
645. Xu Q, Liu JW, He CY, Sun LP, Gong YH, Jing JJ, et al. The interaction effects of pri-let-7a-1 rs10739971 with PGC and ERCC6 gene polymorphisms in gastric cancer and atrophic gastritis. *PLoS One* 2014; 9(2):e89203.
646. Berndt SI, Platz EA, Fallin MD, Thuita LW, Hoffman SC, Helzlsouer KJ. Genetic variation in the nucleotide excision repair pathway and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15(11):2263-69.
647. Kusumoto R, Masutani C, Sugawara K, Iwai S, Araki M, Uchida A, et al. Diversity of the damage recognition step in the global genomic nucleotide excision repair in vitro. *Mutat Res* 2001; 485(3):219-27.
648. Paszkowska-Szczur K, Scott RJ, Górski B, Cybulski C, Kurzawski G, Dymerska D, et al. Polymorphisms in nucleotide excision repair genes and susceptibility to colorectal cancer in the Polish population. *Mol Biol Rep* 2015; 43(3):755-64.
649. Peng Q, Lao X, Tang W, Chen Z, Li R, Qin X, et al. XPC Lys939Gln polymorphism contributes to colorectal cancer susceptibility: evidence from a meta-analysis. *Diagn Pathol* 2014;9:120.
650. Yue AM, Xie ZB, Zhao HF, Guo SP, Shen YH, Wang HP. Associations of ABCB1 and XPC genetic polymorphisms with susceptibility to colorectal cancer and therapeutic prognosis in a Chinese population. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14(5):3085-91.
651. Friedberg EC. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; 1(1):22-33.
652. García-Closas M, Malats N, Real FX, Welch R, Kogevinas M, Chatterjee N, et al. Genetic variation in the nucleotide excision repair pathway and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15(3):536-42.
653. Pan J, Lin J, Izzo JG, Liu Y, Xing J, Huang M, et al. Genetic susceptibility to esophageal cancer: the role of the nucleotide excision repair pathway. *Carcinogenesis* 2009; 30(5):785-92.
654. Robertson AB, Klungland A, Rognes T, Leiros I. DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66(6):981-93.

655. Horton JK, Watson M, Stefanick DF, Shaughnessy DT, Taylor JA, Wilson SH. XRCC1 and DNA polymerase beta in cellular protection against cytotoxic DNA single-strand breaks. *Cell Res* 2008; 18(1):48-63.
656. Monaco R, Rosal R, Dolan MA, Pincus MR, Brandt-Rauf PW. Conformational effects of a common codon 399 polymorphism on the BRCT1 domain of the XRCC1 protein. *Protein J* 2007; 26(8):541-46.
657. Lv H, Li Q, Qiu W, Xiang J, Wei H, Liang H, et al. Genetic polymorphism of XRCC1 correlated with response to oxaliplatin-based chemotherapy in advanced colorectal cancer. *Pathol Oncol Res* 2012; 18(4):1009-14.
658. Ye F, Liu Z, Tan A, Liao M, Mo Z, Yang X. XRCC1 and GSTP1 polymorphisms and prognosis of oxaliplatin-based chemotherapy in colorectal cancer: a meta-analysis. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013; 71(3):733-40.
659. Stoeckelmacher J, Ghaderi V, Iobal S, Groshen S, Tsao-Wei D, Park D, et al. A polymorphism of the XRCC1 gene predicts for response to platinum based treatment in advanced colorectal cancer. *Anticancer Res* 2001; 21(4B):3075-79.
660. Liu Y, Chen H, Chen L, Hu C. Prediction of genetic polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XRCC3 in the survival of colorectal cancer receiving chemotherapy in the Chinese population. *Hepatogastroenterology* 2012; 59(116):977-80.
661. Martínez-Balibrea E, Manzano JL, Martínez-Cardus A, Moran T, Cirauqui B, Catot S, et al. Combined analysis of genetic polymorphisms in thymidylate synthase, uridine diphosphate glucuronosyltransferase and X-ray cross complementing factor 1 genes as a prognostic factor in advanced colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil plus oxaliplatin or irinotecan. *Oncol Rep* 2007; 17(3):637-45.
662. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 2001; 27(3):247-57.
663. Liu N, Lamerdin JE, Tebbs RS, Schild D, Tucker JD, Shen MR, et al. XRCC2 and XRCC3, new human Rad51-family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages. *Mol Cell* 1998; 1(6):783-93.
664. Johnson RD, Liu N, Jasin M. Mammalian XRCC2 promotes the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination. *Nature* 1999; 401(6751):397-99.
665. He Y, Zhang Y, Jin C, Deng X, Wei M, Wu Q, et al. Impact of XRCC2 Arg188His polymorphism on cancer susceptibility: a meta-analysis. *PLoS One* 2014; 9(3):e91202.
666. Zhang Y, Wang H, Peng Y, Liu Y, Xiong T, Xue P, et al. The Arg188His polymorphism in the XRCC2 gene and the risk of cancer. *Tumour Biol* 2014; 35(4):3541-49.
667. Li XB, Luo H, Huang J, Zhang JD, Yang ZX, Sun XW. XRCC2 gene polymorphisms and its protein are associated with colorectal cancer susceptibility in Chinese Han population. *Med Oncol* 2014; 31(11):245.
668. Curtin K, Lin WY, George R, Katory M, Shorto J, Cannon-Albright LA, et al. Genetic variants in XRCC2: new insights into colorectal cancer tumorigenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18(9):2476-84.
669. Krupa R, Sliwinski T, Wisniewska-Jarosinska M, Chojnacki J, Wasylecka M, Dziki L, et al. Polymorphisms in RAD51, XRCC2 and XRCC3 genes of the homologous recombination repair in colorectal cancer--a case control study. *Mol Biol Rep* 2011; 38(4): 2849-54.
670. Zhao Y, Deng X, Wang Z, Wang Q, Liu Y. Genetic polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XRCC3 and risk of colorectal cancer in Chinese population. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13 (2):665-69.
671. Pierce AJ, Johnson RD, Thompson LH, Jasin M. XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. *Genes Dev* 1999; 13(20):2633-38.
672. Margison GP, Povey AC, Kaina B, Koref MFS, et al. Variability and regulation of O-6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis* 2003; 24(4): 625-35.
673. Margison GP, Santibanez-Koref MF. O-6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: role in carcinogenesis and chemotherapy. *Bioessays* 2002; 24(3):255-66.
674. Sharma S, Salehi F, Scheithauer BW, Rotondo F, Syro LV, Kovacs K. Role of MGMT in tumor development, progression, diagnosis, treatment and prognosis. *Anticancer Res* 2009; 29(10):3759-68.
675. Gerson SL. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(4): 296-307.
676. Minoo P. Toward a Molecular Classification of Colorectal Cancer: The Role of MGMT. *Front Oncol* 2013; 3:266.
677. Shima K, Morikawa T, Baba Y, Nosho K, Suzuki M, Yamauchi M, et al. MGMT promoter methylation, loss of expression and prognosis in 855 colorectal cancers. *Cancer Causes Control* 2011; 22 (2):301-09.
678. Ogino S, Hazra A, Tranah GJ, Kirkner GJ, Kawasaki T, Nosho K, et al. MGMT germline polymorphism is associated with somatic MGMT promoter methylation and gene silencing in colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2007; 28(9):1985-90.
679. Esteller M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Watkins DN, et al. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 2000; 60(9): 2368-71.
680. Qi J, Zhu YQ, Huang MF, Yang D. Hypermethylation of CpG island in O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene was associated with K-ras G to A mutation in colorectal tumor. *World J Gastroenterol* 2005; 11 (13):2022-25.
681. Esteller M, Risques RA, Toyota M, Capella G, Moreno V, Peinado MA, et al. Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 2001; 61 (12):4889-92.

682. Bello MJ, Alonso ME, Amiñoso C, Anselmo NP, Arjona D, Gonzalez-Gomez P, et al. Hypermethylation of the DNA repair gene MGMT: association with TP53 G:C to A:T transitions in a series of 469 nervous system tumors. *Mutat Res* 2004; 554(1-2):23-32.
683. Svrcek M, Buhard O, Colas C, Coulet F, Dumont S, Massaoudi I, et al. Methylation tolerance due to an O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) field defect in the colonic mucosa: an initiating step in the development of mismatch repair-deficient colorectal cancers. *Gut* 2010; 59(11):1516-26.
684. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 2006; 38(7):787-93.
685. Kyczer W, Korski K, Łoziński C, Teresiak-Mańczak A, Przybyła A, Mackiewicz A, et al. The anti-cancer actions of O6-methylguanine-DNA-methyltransferase in relation to colon polyps. *Pharmacol Rep* 2014; 66(6):1060-64.
686. Oh K, Redston M, Odze RD. Support for hMLH1 and MGMT silencing as a mechanism of tumorigenesis in the hyperplastic-adenoma-carcinoma (serrated) carcinogenic pathway in the colon. *Hum Pathol* 2005; 36(19):101-11.
687. Kim KM, Lee EJ, Ha S, Kang SY, Jang KT, Park CK, et al. Molecular features of colorectal hyperplastic polyps and sessile serrated adenoma/polyps from Korea. *Am J Surg Pathol* 2011; 35(9):1274-86.
688. Hawkins NJ, Lee JH, Wong JJ, Kwok CT, Ward RL, Hitchins MP. MGMT methylation is associated primarily with the germline C>T SNP (rs16906252) in colorectal cancer and normal colonic mucosa. *Mod Pathol* 2009; 22(12):1588-99.
689. Worthley DL, Whitehall VL, Buttenshaw RL, Irahara N, Greco SA, Ramsnes I, et al. DNA methylation within the normal colorectal mucosa is associated with pathway-specific predisposition to cancer. *Oncogene* 2010; 19(11):1653-62.
690. Farzanehfar M, Vossoughinia H, Jabini R, Tavassoli A, Saadatnia H, Khorashad AK, et al. Evaluation of methylation of MGMT (O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase) gene promoter in sporadic colorectal cancer. *DNA Cell Biol* 2013; 32 (7):371-77.
691. Shen L, Kondo Y, Rosner GL, Xiao L, Hernandez NS, Vilaythong J, et al. MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(18):1330-38.
692. Amatu A, Sartore-Bianchi A, Moutinho C, Belotti A, Bencardino K, Chirico G, et al. Promoter CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme MGMT predicts clinical response to dacarbazine in a phase II study for metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2013; 19(8):2265-72.
693. Shacham-Shmueli E, Beny A, Geva R, Blachar A, Figer A, Aderka D. Response to temozolamide in patients with metastatic colorectal cancer with loss of MGMT expression: a new approach in the era personalized medicine? *J Clin Oncol* 2011; 29 (19):e262-65.
694. Tranah GJ, Bugni J, Giovannucci E, Ma J, Fuchs C et al. O6-methylguanine-DNA methyltransferase Leu84Phe and Ile143Val polymorphisms and risk of colorectal cancer in the Nurses' Health Study and Physicians' Health Study (United States). *Cancer Causes Control* 2006; 17(5):721-31.
695. Qiu ZX, Xue F, Shi XF, He X, Ma HN, Chen L, et al. Effects of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) polymorphisms on cancer: a meta-analysis. *Mutagenesis* 2010; 25(1):83-95.
696. Liu J, Zhang R, Chen F, Yu C, Sun Y, Jia C, et al. MGMT Leu84Phe polymorphism contributes to cancer susceptibility: evidence from 44 case-control studies. *PLoS One* 2013; 8(9):e75367.
697. Du L, Wang H, Xiong T, Ma Y, Yang J, Huang J, et al. The polymorphisms in the MGMT gene and the risk of cancer: a meta-analysis. *Tumour Biol* 2013; 34(5): 3227-37.
698. Park JH, Kim NS, Park JY, Chae YS, Kim JG, Sohn SK, et al. MGMT -535G>T polymorphism is associated with prognosis for patients with metastatic colorectal cancer treated with oxaliplatin-based chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136(8):1135-42.
699. Sau A, Pellizzari Tregno F, Valentino F, Federici G, Caccuri AM. Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance. *Arch Biochem Biophys* 201; 500(2):116-22.
700. Lo HW, Ali-Osman F. Genet polymorphism and function of glutathione S-transferase in tumor drug resistance. *Curr Opin Pharmacol* 2007; 7(4):367-74.
701. Doğru-Abbasoğlu S, Mutlu-Türkoğlu U, Türkoğlu S, Erbil Y, Barbaros U, Uysal M et al. Glutathione S-transferase-pi in malignant tissues and plasma of human colorectal and gastric cancers. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002; 128(2):91-95.
702. Tan KL, Jankova L, Chan C, Fung CL, Clarke C, Lin BP, et al. Clinicopathological correlates and prognostic significance of glutathione S-transferase Pi expression in 468 patients after potentially curative resection of node-positive colonic cancer. *Histopathology* 2011; 59(6):1057-70.
703. Mulder TP, Verspaget HW, Sier CF, Roelofs HM, Ganesh S, Griffioen G, et al. Glutathione S-transferase pi in colorectal tumors is predictive for overall survival. *Cancer Res* 1995; 55(12):2696-2702.
704. Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao JX, Buolamwini J. Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *J Biol Chem* 1997; 272(15):10004-12.
705. Watson MA, Stewart RK, Smith GB, Massey TE, Bell DA. Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis* 1998; 19(2):275-80.

706. Hong J, Han SW, Ham HS, Kim TY, Choi IS, Kim BS, et al. Phase II study of biweekly S-1 and oxaliplatin combination chemotherapy in metastatic colorectal cancer and pharmacogenetic analysis. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011; 67(6):1323-31.
707. Jun L, Haiping Z, Beibei Y. Genetic polymorphisms of GSTP1 related to response to 5-FU-oxaliplatin-based chemotherapy and clinical outcome in advanced colorectal cancer patients. *Swiss Med Wkly* 2009; 139(49-50):724-28.
708. Stoehlmacher J, Park DJ, Zhang W, Groshen S, Tsao-Wei DD, Yu MC, et al. Association between glutathione S-transferase P1, T1, and M1 genetic polymorphism and survival of patients with metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94(12):936-42.
709. Kweekel DM, Antonini NF, Nortier JW, Punt CJ, Gelderblom H, Guchelaar HJ. Explorative study to identify novel candidate genes related to oxaliplatin efficacy and toxicity using a DNA repair array. *Br J Cancer* 2009; 101(2):357-62.
710. Kap EJ, Richter S, Rudolph A, Jansen L, Ulrich A, Hoffmeister M, et al. Genetic variants in the glutathione S-transferase genes and survival in colorectal cancer patients after chemotherapy and differences according to treatment with oxaliplatin. *Pharmacogenet Genomics* 2014; 24(7):340-47.
711. Funke S, Timofeeva M, Risch A, Hoffmeister M, Stegmaier C, Seiler CM, et al. Genetic polymorphisms in GST genes and survival of colorectal cancer patients treated with chemotherapy. *Pharmacogenomics* 2010; 11(1):33-41.
712. Lecomte T, Landi B, Beaune P, Laurent-Puig P, Lloria MA. Glutathione S-transferase P1 polymorphism (Ile105Val) predicts cumulative neuropathy in patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2006; 12(10):3050-56.
713. Kanai M, Yoshioka A, Tanaka S, Nagayama S, Matsumoto S, Nishimura T, et al. Associations between glutathione S-transferase pi Ile105Val and glyoxylate aminotransferase Pro11Leu and Ile340Met polymorphisms and early-onset oxaliplatin-induced neuropathy. *Cancer Epidemiol* 2010; 34 (2):189-93.
714. Peng Z, Wang Q, Gao J, Ji Z, Yuan J, Tian Y, et al. Association between GSTP1 Ile105Val polymorphism and oxaliplatin-induced neuropathy: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013; 72(2):305-14.
715. Laskin JJ, Sandler AB. Epidermal growth factor receptor: a promising target in solid tumours. *Cancer Treat Rev* 2014; 30(1):1-17.
716. Coldren CD, Helfrich BA, Witta SE, Sugita M, Lapadat R, Zeng C, et al. Baseline gene expression predicts sensitivity to gefitinib in non-small cell lung cancer cell lines. *Mol Cancer Res* 2006; 4(8):521-28.
717. Zhu X, Zhang F, Zhang W, He J, Zhao Y, Chen X. Prognostic role of epidermal growth factor receptor in head and neck cancer: a meta-analysis. *J Surg Oncol* 2013; 108(6):387-97.
718. De Jong KP, Stellema R, Karrenbeld A, Koudstaal J, Gouw AS, Sluiter WJ, et al. Clinical relevance of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, p53, and Ki67 in colorectal liver metastases and corresponding primary tumors. *Hepatology* 1998; 28(4):971-79.
719. Gebhardt F, Bürger H, Brandt B. Modulation of EGFR gene transcription by a polymorphic repetitive sequence--a link between genetics and epigenetics. *Int J Biol Markers* 2000; 15(1):105-10.
720. Buerger H, Gebhardt F, Schmidt H, Beckmann A, Hutmacher K, Simon R, et al. Length and loss of heterozygosity of an intron 1 polymorphic sequence of egfr is related to cytogenetic alterations and epithelial growth factor receptor expression. *Cancer Res* 2000; 60(4):854-57.
721. Graziano F, Ruzzo A, Loupakis F, Canestrari E, Santini D, Catalano V, et al. Pharmacogenetic profiling for cetuximab plus irinotecan therapy in patients with refractory advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26(9):1427-34.
722. Liu G, Gurubhagavatula S, Zhou W, Wang Z, Yeap BY, Asomaning K, et al. Epidermal growth factor receptor polymorphisms and clinical outcomes in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *Pharmacogenomics J* 2008; 8(2):129-38.
723. Lai CY, Sung FC, Hsieh LL, Tang R, Chiou HY, Wu FY, et al. Associations between genetic polymorphisms of epidermal growth factor receptor (EGFR) and survival of colorectal cancer (CRC) patients treated with 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Ann Surg Oncol* 2013; 20 (suppl 3):S599-606.
724. Press OA, Zhang W, Gordon MA, Yang D, Lurje G, Iqbal S, et al. Gender-related survival differences associated with EGFR polymorphisms in metastatic colon cancer. *Cancer Res* 2008; 68(8):3037-42.
725. Zhang W, Stoehlmacher J, Park DJ, Yang D, Borchard E, Gil J, et al. Gene polymorphisms of epidermal growth factor receptor and its downstream effector, interleukin-8, predict oxaliplatin efficacy in patients with advanced colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2005; 5(2):124-31.
726. Zhang W, Park DJ, Lu B, Yang DY, Gordon M, Groshen S, et al. Epidermal growth factor receptor gene polymorphisms predict pelvic recurrence in patients with rectal cancer treated with chemoradiation. *Clin Cancer Res* 2005; 11(2 Pt 1):600-05.
727. Lurje G, Zhang W, Schultheis AM, Yang D, Groshen S, Hendifar E, et al. Polymorphisms in VEGF and IL-8 predict tumor recurrence in stage III colon cancer. *Ann Oncol* 2008; 19(10):1734-41.
728. Pander J, Gelderblom H, Antonini NF, Tol J, van Krieken JH, van der Straaten T, et al. Correlation of FCGR3A and EGFR germline polymorphisms with the efficacy of cetuximab in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2010; 46(10):1829-34.

729. Moriai T, Kobrin MS, Hope C, Speck L, Korc M. A variant epidermal growth factor receptor exhibits altered type alpha transforming growth factor binding and transmembrane signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(21):10217-21.
730. Wang WS, Chen PM, Chiou TJ, Liu JH, Lin JK, Lin TC, et al. Epidermal growth factor receptor R497K polymorphism is a favorable prognostic factor for patients with colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13(12):3597-604.
731. Gerger A, El-Khoueiry A, Zhang W, Yang D, Singh H, Bohanes P, et al. Pharmacogenetic angiogenesis profiling for first-line bevacizumab plus oxaliplatin-based chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17(17):5783-92.
732. Liu W, Innocenti F, Wu MH, Desai AA, Dolan ME, Cook EH Jr, et al. A functional common polymorphism in a Sp1 recognition site of the epidermal growth factor receptor gene promoter. *Cancer Res* 2005; 65(1):46-53.
733. Liu W, Wu X, Zhang W, Montenegro RC, Fackenthal DL, Spitz JA, et al. Relationship of EGFR mutations, expression, amplification, and polymorphisms to epidermal growth factor receptor inhibitors in the NCI60 cell lines. *Clin Cancer Res* 2007; 13(22 Pt 1):6788-95.
734. Spindler KL, Nielsen JN, Lindebjerg J, Brandslund I, Jakobsen A. Prediction of response to chemoradiation in rectal cancer by a gene polymorphism in the epidermal growth factor receptor promoter region. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 66(2):500-04.
735. Spindler KL, Nielsen JN, Ornskov D, Brandslund I, Jakobsen A. Epidermal growth factor (EGF) A61G polymorphism and EGF gene expression in normal colon tissue from patients with colorectal cancer. *Acta Oncol* 2007; 46(8):1113-17.
736. Zhang W, Gordon M, Press OA, Rhodes K, Vallböhmer D, Yang DY, et al. Cyclin D1 and epidermal growth factor polymorphisms associated with survival in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *Pharmacogenet Genomics* 2006; 16(7):475-83.
737. Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A, Testa JR. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv Cancer Res* 2005; 94:29-86.
738. Altomare DA, Testa JR. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* 2005; 24(50):7455-64.
739. Slattery ML, Herrick JS, Lundgreen A, Fitzpatrick FA, Curtin K, Wolff RK. Genetic variation in a metabolic signaling pathway and colon and rectal cancer risk: mTOR, PTEN, STK11, RPKAA1, PRKAG2, TSC1, TSC2, PI3K and Akt1. *Carcinogenesis* 2010; 31(9):1604-11.
740. Kim MJ, Kang HG, Lee SY, Jeon HS, Lee WK, Park JY, et al. AKT1 polymorphisms and survival of early stage non-small cell lung cancer. *J Surg Oncol* 2012; 105(2):167-74.
741. Chen M, Gu J, Delclos GL, Killary AM, Fan Z, Hildebrandt MA, et al. Genetic variations of the PI3K-AKT-mTOR pathway and clinical outcome in muscle invasive and metastatic bladder cancer patients. *Carcinogenesis* 2010; 31(8):1387-91.
742. Hildebrandt MA, Yang H, Hung MC, Izzo JG, Huang M, Lin J, et al. Genetic variations in the PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway are associated with clinical outcomes in esophageal cancer patients treated with chemoradiotherapy. *J Clin Oncol* 2009; 27(6):857-71.
743. Kim JG, Chae YS, Sohn SK, Kang BW, Moon JH, Lee SJ, et al. Clinical significance of genetic variations in the PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway in Korean patients with colorectal cancer. *Oncology* 2010; 79(3-4):278-82.
744. Shao J, Li Y, Zhao P, Yue X, Jiang J, Liang X, et al. Association of mTOR polymorphisms with cancer risk and clinical outcomes: a meta-analysis. *PLoS One* 2014; 9(5):e97085.
745. Cao Q, Ju X, Li P, Meng X, Shao P, Cai H, et al. A functional variant in the MTOR promoter modulates its expression and is associated with renal cell cancer risk. *PLoS One* 2012; 7(11):e50302.
746. Li Q, Gu C, Zhu Y, Wang M, Yang Y, Jin L, et al. Polymorphisms in the mTOR gene and risk of sporadic prostate cancer in an Eastern Chinese population. *PLoS One* 2013; 8(8):e71968.
747. Zhu ML, Yu H, Shi TY, He J, Wang MY, Li QX, et al. Polymorphisms in mTORC1 genes modulate risk of esophageal squamous cell carcinoma in eastern Chinese populations. *J Thorac Oncol* 2013; 8(6): 788-95.
748. Xu M, Tao G, Kang M, Gao Y, Zhu H, Gong W, et al. A polymorphism (rs2295080) in mTOR promoter region and its association with gastric cancer in a Chinese population. *PLoS One* 2013; 8(3):e60080.
749. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144 (5):646-74.
750. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 2008; 358(19):2039-49.
751. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29(6):789-91.
752. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (VEGFR) signaling in angiogenesis: a crucial target for anti- and pro-angiogenic therapies. *Genes Cancer* 2011; 2(12):1907-105.
753. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005; 23(5):1011-27.
754. Ahluwalia A, Jones MK, Matysiak-Budnik T, Tarnawski AS. VEGF and colon cancer growth beyond angiogenesis: does VEGF directly mediate colon cancer growth via a non-angiogenic mechanism? *Curr Pharm Des* 2014; 20(7):1041-44.
755. Jain L, Vargo CA, Danesi R, Sissung TM, Price DK, Venzon D, et al. The role of vascular endothelial growth factor SNPs as predictive and prognostic markers for major solid tumors. *Mol Cancer Ther* 2009; 8(9):2496-508

756. Eng L, Azad AK, Habbous S, Pang V, Xu W, Maitland-van der Zee AH, et al. Vascular endothelial growth factor pathway polymorphisms as prognostic and pharmacogenetic factors in cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Cancer Res* 2012; 18(17):4526-37.
757. Hansen TF, Spindler KL, Lorentzen KA, Olsen DA, Andersen RF, Lindebjerg J, et al. The importance of -460 C/T and +405 G/C single nucleotide polymorphisms to the function of vascular endothelial growth factor A in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136(5):751-58.
758. Zhao Z, Ba C, Wang W, Wang X, Xue R, Wu X. Vascular endothelial growth factor (VEGF) gene polymorphisms and colorectal cancer: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Genet Test Mol Biomarkers* 2012; 16(12):1390-94.
759. Hansen TF, Jakobsen A. Clinical implications of genetic variations in the VEGF system in relation to colorectal cancer. *Pharmacogenomics* 2011; 12(12):1681-93.
760. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005; 307(5706):58-62.
761. Kim JG, Chae YS, Sohn SK, Cho YY, Moon JH, Park JY, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms associated with prognosis for patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14(1):62-66.
762. Kjaer-Frifeldt S, Fredslund R, Lindebjerg J, Hansen TF, Spindler KL, Jakobsen A; Danish Colorectal Cancer Group. Prognostic importance of VEGF-A haplotype combinations in a stage II colon cancer population. *Pharmacogenomics* 2012; 13(7):763-70.
763. Dong G, Guo X, Fu X, Wan S, Zhou F, Myers RE, et al. Potentially functional genetic variants in KDR gene as prognostic markers in patients with resected colorectal cancer. *Cancer Sci* 2012; 103(3):561-68.
764. Hansen TF, Spindler KL, Andersen RF, Lindebjerg J, Kølvrå S, Brandslund I, et al. The prognostic value of haplotypes in the vascular endothelial growth factor a gene in colorectal cancer. *Cancers (Basel)* 2010; 2(3):1405-18.
765. Dassoulas K, Gazouli M, Rizos S, Theodoropoulos G, Christoni Z, Nikiteas N, et al. Common polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and colorectal cancer development, prognosis, and survival. *Mol Carcinog* 2009; 48(6):563-69.
766. Hansen TF, Sørensen FB, Spindler KL, Olsen DA, Andersen RF, Lindebjerg J, et al. Microvessel density and the association with single nucleotide polymorphisms of the vascular endothelial growth factor receptor 2 in patients with colorectal cancer. *Virchows Arch* 2010; 456(3):251-60.
767. Vidaurreta M, Sánchez-Muñoz R, Veganzones S, Rafael S, Gutiérrez M, de-la-Orden V, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in patients with colorectal cancer. *Rev Esp Enferm Dig* 2010; 102(1):20-31.
768. Lurje G, Hendifar AE, Schultheis AM, Pohl A, Husain H, Yang D, et al. Polymorphisms in interleukin 1 beta and interleukin 1 receptor antagonist associated with tumor recurrence in stage II colon cancer. *Pharmacogenet Genomics* 2009; 19(2):95-102.
769. Slattery ML, Lundgreen A, Wolff RK. EGFA, FLT1, KDR and colorectal cancer: assessment of disease risk, tumor molecular phenotype, and survival. *Mol Carcinog* 2014; 53 (Suppl 1):E140-50.
770. Formica V, Palmirotta R, Del Monte G, Savonarola A, Ludovici G, De Marchis ML, et al. Predictive value of VEGF gene polymorphisms for metastatic colorectal cancer patients receiving first-line treatment including fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab. *Int J Colorectal Dis* 2011; 26(2):143-51.
771. Loupakis F, Cremolini C, Yang D, Salvatore L, Zhang W, Wakatsuki T, et al. Prospective validation of candidate SNPs of VEGF/VEGFR pathway in metastatic colorectal cancer patients treated with first-line FOLFIRI plus bevacizumab. *PLoS One* 2013; 8(7):e66774.
772. Loupakis F, Ruzzo A, Salvatore L, Cremolini C, Masi G, Frumento P, et al. Retrospective exploratory analysis of VEGF polymorphisms in the prediction of benefit from first-line FOLFIRI plus bevacizumab in metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer* 2011; 11:247.
773. Loupakis F, Cremolini C, Fioravanti A, Orlandi P, Salvatore L, Masi G, et al. Pharmacodynamic and pharmacogenetic angiogenesis-related markers of first-line FOLFOXIRI plus bevacizumab schedule in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2011; 104(8):1262-69.
774. Pander J, Wessels JA, Gelderblom H, van der Straaten T, Punt CJ, Guchelaar HJ. Pharmacogenetic interaction analysis for the efficacy of systemic treatment in metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2011; 22(5):1147-53.
775. Hansen TF, Garm Spindler KL, Andersen RF, Lindebjerg J, Brandslund I, et al. The predictive value of genetic variations in the vascular endothelial growth factor A gene in metastatic colorectal cancer. *Pharmacogenomics J* 2011; 11(1):53-60.
776. Hansen TF, Christensen Rd, Andersen RF, Garm Spindler KL, Johnsson A, Jakobsen A. The predictive value of single nucleotide polymorphisms in the VEGF system to the efficacy of first-line treatment with bevacizumab plus chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer: results from the Nordic ACT trial. *Int J Colorectal Dis* 2012; 27(6):715-20.
777. Bécouarn Y, Cany L, Pulido M, Beyssac R, Texereau P, Le Morvan V, et al. FOLFIRI® and bevacizumab in first-line treatment for colorectal cancer patients: safety, efficacy and genetic polymorphisms. *BMC Res Notes* 2014; 7:260.
778. Jang MJ, Kim JW, Jeon YJ, Chong SY, Oh D, Kim NK. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in patients with colorectal cancer. *Int J Clin Oncol* 2013; 18(6):1032-41.
779. Koutras AK, Antonacopoulou AG, Eleftheraki AG, Dimitrakopoulos FI, Koumariannou A, Varthalitis I, et al. Vascular endothelial growth factor polymorphisms and clinical outcome in colorectal cancer patients treated with irinotecan-based chemotherapy and bevacizumab. *Pharmacogenomics J* 2012; 12(6):468-75.

780. Chen MH, Tzeng CH, Chen PM, Lin JK, Lin TC, Chen WS, et al. VEGF -460T → C polymorphism and its association with VEGF expression and outcome to FOLFOX-4 treatment in patients with colorectal carcinoma. *Pharmacogenomics J* 2011; 11(3):227-36.
781. Murphy JE, Liebman HM, Zhou Q, Bote JT, Daskalova A, Hooshmand SM, et al. Functional SNPs in vascular endothelial growth factor (*VEGF-A*) and overall survival (OS) in bevacizumab-treated patients with metastatic colorectal cancer (mCRC). *J Clin Oncol* 2012 (suppl; abstr 3594).
782. Lambrechts D, Delmar P, Miles DW, Leighl N, Saltz L, et al. Single nucleotide polymorphism analysis and outcome in advanced-stage cancer patients treated with bevacizumab. *Eur J Cancer* 2011; 47(S1): S173.
783. Lo Giudice L, Di Salvatore M, Astone A, Rodriquenz M, Nazzicone G, Cassano A, et al. Polymorphisms in VEGF, eNOS, COX-2, and IL-8 as predictive markers of response to bevacizumab. *J Clin Oncol* 2010 (suppl; abstr13502).
784. Sohn BS, Park SJ, Kim JE, Kim KP, Hong YS, Suh C, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the vascular endothelial growth factor pathway and outcomes of patients treated with first-line cytotoxic chemotherapy combined with bevacizumab for advanced colorectal cancer. *Oncology* 2014; 87 (5):280-92.
785. Jang MJ, Jeon YJ, Kim JW, Cho YK, Lee SK, Hwang SG, et al. Association of VEGF and KDR single nucleotide polymorphisms with colorectal cancer susceptibility in Koreans. *Mol Carcinog* 2013; 52 (suppl 1): E60-69.
786. Duff SE, Jeziorska M, Rosa DD, Kumar S, Haboubi N, Sherlock D, et al. Vascular endothelial growth factors and receptors in colorectal cancer: implications for anti-angiogenic therapy. *Eur J Cancer* 2006; 42(1):112-17.
787. Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14(21):6735-41.
788. Li A, Varney ML, Valasek J, Godfrey M, Dave BJ, Singh RK. Autocrine role of interleukin-8 in induction of endothelial cell proliferation, survival, migration and MMP-2 production and angiogenesis. *Angiogenesis* 2005; 8(1):63-71.
789. Strieter RM, Burdick MD, Mestas J, Gomperts B, Keane MP, Belperio JA. Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis. *Eur J Cancer* 2006; 42(6):768-78.
790. Hull J, Thompson A, Kwiatkowski D. Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families. *Thorax* 2000; 55(12):1023-27.
791. Carmi Y, Dotan S, Rider P, Kaplanov I, White MR, Baron R, et al. The role of IL-1 β in the early tumor cell-induced angiogenic response. *J Immunol* 2013; 190(7):3500-09.
792. Pociot F, Mølviig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur J Clin Invest* 1992; 22(6):396-402.
793. Burada F, Dumitrescu T, Nicoli R, Ciurea ME, Angelescu C, Mixich F, et al. IL-1RN +2018T>C polymorphism is correlated with colorectal cancer. *Mol Biol Rep* 2013; 40(4):2851-57.
794. Xu J, Yin Z, Cao S, Gao W, Liu L, Yin Y, et al. Systematic review and meta-analysis on the association between IL-1B polymorphisms and cancer risk. *PLoS One* 2013; 8(5):e63654
795. Zhang Y, Liu C, Peng H, Zhang J, Feng Q. IL1 receptor antagonist gene IL1-RN variable number of tandem repeats polymorphism and cancer risk: a literature review and meta-analysis. *PLoS One* 2012; 7(9): e46017.
796. Cascone T, Heymach JV. Targeting the angiopoietin/Tie2 pathway: cutting tumor vessels with a double-edged sword? *J Clin Oncol* 2012; 30(4):441-44.
797. Dai J, Wan S, Zhou F, Myers RE, Guo X, Li B, et al. Genetic polymorphism in a VEGF-independent angiogenesis gene *ANGPT1* and overall survival of colorectal cancer patients after surgical resection. *PLoS One* 2012; 7(4):e34758.
798. Hall MD, Okabe M, Shen DW, Liang XJ, Gottesman MM. The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2008; 48:495-535.
799. Howell SB, Safaei R, Larson CA, Sailor MJ. Copper transporters and the cellular pharmacology of the platinum-containing cancer drugs. *Mol Pharmacol* 2010; 77(6):887-94.
800. Wang L, Sweet DH. Renal organic anion transporters (SLC22 family): expression, regulation, roles in toxicity, and impact on injury and disease. *AAPS* 2013; 15(1):53-69.
801. Burger H, Loos WJ, Eechoute K, Verweij J, Mathijssen RH, Wiemer EA. Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance. *Drug Resist Updat* 2011; 14(1):22-34.
802. Martínez-Balibrea E, Martínez-Cardús A, Musulén E, Ginés A, Manzano JL, Aranda E, et al. Increased levels of copper efflux transporter *ATP7B* are associated with poor outcome in colorectal cancer patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy. *Int J Cancer* 2009; 124 (12):2905-10.
803. Lin PC, Lin HH, Lin JK, Lin CC, Yang SH, Li AF, et al. Expression of *ABCG2* associated with tumor response in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line FOLFOX therapy--preliminary evidence. *Int J Biol Markers* 2013; 28(2):182-86.
804. Bruhn O and Cascorbi I. Polymorphisms of the drug transporters *ABCB1*, *ABCG2*, *ABCC2* and *ABCC3* and their impact on drug bioavailability and clinical relevance. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2014; 10(10):1337-54.
805. Vasiliou V, Vasiliou K, Nebert DW. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics* 2009; 3(3):281-90.
806. Samanian S, Mahjoubi F, Mahjoubi B, Mirzaee R, Azizi R. *MDR1* gene polymorphisms: possible association with its expression and clinicopathology characteristics in colorectal cancer patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011; 12(11):3141-45.
807. Koyama T, Nakamura T, Komoto C, Sakaeda T, Taniguchi M, Okamura N, et al. *MDR1* T-129C polymorphism can be predictive of differentiation, and thereby prognosis of colorectal adenocarcinomas in Japanese. *Biol Pharm Bull* 2006; 29(7):1449-53.

808. He T, Mo A, Zhang K, Liu L. ABCB1/MDR1 gene polymorphism and colorectal cancer risk: a meta-analysis of case-control studies. *Colorectal Dis* 2013; 15(1):12-8.
809. Zhao L, Li K, Li W, Yang Z. Association between the C3435T polymorphism of ABCB1/MDR1 gene (rs1045642) and colorectal cancer susceptibility: a meta-analysis based on 11,339 subjects. *Tumour Biol* 2013; 34(3):1949-57.
810. Andersen V, Vogel U. Interactions between meat intake and genetic variation in relation to colorectal cancer. *Genes Nutr* 2015; 10(1): 448.
811. Campa D, Sainz J, Pardini B, Vodickova L, Naccarati A, Rudolph A, et al. A comprehensive investigation on common polymorphisms in the MDR1/ABCB1 transporter gene and susceptibility to colorectal cancer. *PLoS One* 2012; 7(3):e32784.
812. Panczyk M, Balcerczak E, Piaskowski S, Jamrozik K, Pasz-Walczak G, Mirowski M. ABCB1 gene polymorphisms and haplotype analysis in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2009; 24(8):895-905.
813. Wu H, Kang H, Liu Y, Xiao Q, Zhang Y, Sun M, et al. Association of ABCB1 genetic polymorphisms with susceptibility to colorectal cancer and therapeutic prognosis. *Pharmacogenomics* 2013; 14(8):897-911.
814. Balcerczak E, Panczyk M, Piaskowski S, Pasz-Walczak G, Sałagacka A, Mirowski M. ABCB1/MDR1 gene polymorphisms as a prognostic factor in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2010; 25(10):1167-76.
815. Kunická T, Souček P. Importance of ABCC1 for cancer therapy and prognosis. *Drug Metab Rev* 2014; 46(3):325-42.
816. Ballatori N, Hammond CL, Cunningham JB, Krance SM, Marchan R. Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFRT/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 204 (3):238-255.
817. Gamelin L, Capitain O, Morel A, Dumont A, Traore S, Anne le B, et al. Predictive factors of oxaliplatin neurotoxicity: the involvement of the oxalate outcome pathway. *Clin Cancer Res* 2007; 13(21):6359-68.
818. Cusatis G, Sparreboom A. Pharmacogenomic importance of ABCG2. *Pharmacogenomics* 2008; 9(8):1005-09.
819. Lepper ER, Nooter K, Verweij J, Acharya MR, Figg WD, Sparreboom A. Mechanisms of resistance to anticancer drugs: the role of the polymorphic ABC transporters ABCB1 and ABCG2. *Pharmacogenomics* 2005; 6(2):115-38.
820. Campa D, Pardini B, Naccarati A, Vodickova L, Novotny J, Försti A, et al. A gene-wide investigation on polymorphisms in the ABCG2/BRCP transporter and susceptibility to colorectal cancer. *Mutat Res* 2008; 645(1-2):56-60.
821. Chen P, Zhao L, Zou P, Xu H, Lu A, Zhao P. The contribution of the ABCG2 C421A polymorphism to cancer susceptibility: a meta-analysis of the current literature. *BMC Cancer* 2012; 12:383.
822. Li N, Song Y, Du P, Shen Y, Yang J, Gui L, et al. Oral topotecan: Bioavailability, pharmacokinetics and impact of ABCG2 genotyping in Chinese patients with advanced cancers. *Biomed Pharmacother* 2013; 67(8):801-06.
823. Li J, Cusatis G, Brahmer J, Sparreboom A, Robey RW, Bates SE, et al. Association of variant ABCG2 and the pharmacokinetics of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in cancer patients. *Cancer Biol Ther* 2007; 6(3):432-38.
824. Theile D, Grebhardt S, Haefeli WE, Weiss J. Involvement of drug transporters in the synergistic action of FOLFOX combination chemotherapy. *Biochem Pharmacol* 2009; 78(11):1366-73.
825. Lin PC, Lin HH, Lin JK, Lin CC, Yang SH, Li AF, et al. Expression of ABCG2 associated with tumor response in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line FOLFOX therapy--preliminary evidence. *Int J Biol Markers* 2013; 28(2):182-86.
826. Wang X, Xia B, Liang Y, Peng L, Wang Z, Zhuo J, et al. Membranous ABCG2 expression in colorectal cancer independently correlates with shortened patient survival. *Cancer Biomark* 2013; 13(2): 81-88.
827. Daniels J, Kadlubar S. Sulfotransferase genetic variation: from cancer risk to treatment response. *Drug Metab Rev* 2013; 45(4):415-22.
828. Lin ZN, Lin YC, Zhang X, Kadlubar S, Tuo J, Green B, et al. Differential promoter activities of functional haplotypes in the 5'-flanking region of human sulfotransferase 1A1. *J Biochem Mol Toxicol* 2012; 26 (10):422-28.
829. Yu X, Dhakal IB, Beggs M, Edavana VK, Williams S, Zhang X, et al. Functional genetic variants in the 3'-untranslated region of sulfotransferase isoform 1A1 (SULT1A1) and their effect on enzymatic activity. *Toxicol Sci* 2010; 118(2):391-403.
830. Lilla C, Risch A, Verla-Tebit E, Hoffmeister M, Brenner H, Chang-Claude J. SULT1A1 genotype and susceptibility to colorectal cancer. *Int J Cancer* 2007; 120(1):201-06.
831. Sun Y, Zang Z, Xu X, Zhang Z, Zhong L, Zan W, et al. The association of SULT1A1 codon 213 polymorphism and breast cancer susceptibility: meta-analysis from 16 studies involving 23,445 subjects. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 125(1):215-19.
832. Tengström M, Mannermaa A, Kosma VM, Hirvonen A, Kataja V. SULT1A1 rs9282861 polymorphism-a potential modifier of efficacy of the systemic adjuvant therapy in breast cancer? *BMC Cancer* 2012; 12:257.
833. Deeken JF, Cormier T, Price DK, Sissung TM, Steinberg SM, Tran K, et al. A pharmacogenetic study of docetaxel and thalidomide in patients with castration-resistant prostate cancer using the DMET genotyping platform. *Pharmacogenomics J* 2010; 10(3): 191-99.
834. Ley K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol Med* 2003; 9(6): 263-8.
835. Barthel SR, Gavino JD, Descheny L, Dimitroff CJ. Targeting selectins and selectin ligands in inflammation and cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2007; 11(11):1473-91.

836. Alexiou D, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Zbar A, Kremmyda A, Bramis I, et al. Serum levels of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in colorectal cancer patients: correlations with clinicopathological features, patient survival and tumour surgery. *Eur J Cancer* 2001; 37(18):2392-2397.
837. Alexiou D, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Zbar A, Sekara E, Michail P, et al. Clinical significance of serum levels of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in gastric cancer patients. *Am J Gastroenterol* 2003; 98(2):478-85.
838. Dymicka-Piekarska V, Kemona H. Does colorectal cancer clinical advancement affect adhesion molecules (sP-selectin, sE-selectin and ICAM-1) concentration? *Thromb Res* 2009; 124(1):80-83.
839. Bal N, Kocer NE, Ertorer ME, Canpolat ET, Kayaselcuk F, et al. Maspin, E-selectin, and P-selectin expressions in papillary thyroid carcinomas and their correlation with prognostic parameters. *Pathol Res Pract* 2008; 204 (10): 743-50.
840. Revelle BM, Scott D, Beck PJ. Single amino acid residues in the E- and P-selectin epidermal growth factor domains can determine carbohydrate binding specificity. *J Biol Chem* 1996; 271(27):16160-70.
841. Kontogianni P, Zambirinis CP, Theodoropoulos G, Gazouli M, Michalopoulos NV, Flessas J, et al. The impact of the stromal cell-derived factor-1-3'A and E-selectin S128R polymorphisms on breast cancer. *Mol Biol Rep* 2013; 40(1): 43-50.
842. Liarmakopoulos E, Gazouli M, Aravantinos G, Theodoropoulos G, Rizos S, Vaiopoulou A, et al. E-Selectin S128R gene polymorphism in gastric cancer. *Int J Biol Markers* 2013; 28(1):38-42.
843. Xia HZ, Du WD, Wu Q, Chen G, Zhou Y, Tang XF, et al. E-selectin rs5361 and FCGR2A rs1801274 variants were associated with increased risk of gastric cancer in a Chinese population. *Mol Carcinog* 2012; 51(8):597-607.
844. Naidu R, Har YC, Taib NA. Polymorphic variant Ser128Arg of E-Selectin is associated with breast cancer risk and high grade tumors. *Onkologie* 2011; 34(11):592-97.
845. Panoussopoulos GS, Theodoropoulos G, Michalopoulos NV, Gazouli M, Flessas J, Taka S, et al. Analysis of E-Selectin S128R gene polymorphism in pancreatic cancer. *J Surg Oncol* 2010; 102(6): 604-07.
846. Cheng DY, Hao YW, Zhou WL, Ma YR. E-selectin S128R polymorphism is associated with cancer risk: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15(7):3247-52.
847. Hebbar M, Adenis A, Revillion F, Duhamel A, Romano O, Truant S, et al. E-selectin gene S128R polymorphism is associated with poor prognosis in patients with stage II or III colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2009; 45(10): 1871-76.
848. Hopkins AM, Baird AW, Nusrat A. Icam-1: Targeted docking for exogenous as well as endogenous ligands. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56(6):763-78.
849. Roland CL, Harken AH, Sarr MG, Barnett CC Jr. Icam-1 expression determines malignant potential of cancer. *Surgery* 2007; 141(6):705-07.
850. Melis M, Pace E, Siena L, Spatafora M, Tipa A, Profita M, et al. Biologically active intercellular adhesion molecule-1 is shed as dimers by a regulated mechanism in the inflamed pleural space. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167(8):1131-38.
851. Maruo Y, Gochi A, Kaihara A, Shimamura H, Yamada T, Tanaka N, et al. ICAM-1 expression and the soluble ICAM-1 level for evaluating the metastatic potential of gastric cancer. *Int J Cancer* 2002; 100 (4): 486-90.
852. Tung SY, Chang SF, Chou MH, Huang WS, Hsieh YY, Shen CH, et al. CXC chemokine ligand 12/stromal cell-derived factor-1 regulates cell adhesion in human colon cancer cells by induction of intercellular adhesion molecule-1. *J Biomed Sci* 2012;19:91.
853. Kammerer S, Roth RB, Reneland R, Marnellos G, Hoyal CR, Markward NJ, et al. Large-scale association study identifies ICAM gene region as breast and prostate cancer susceptibility locus. *Cancer Res* 2004; 64(24):8906-10.
854. Tian MM, Sun Y, Li ZW, Wu Y, Zhao AL, Li JY. Polymorphisms of ICAM-1 are associated with gastric cancer risk and prognosis. *World J Gastroenterol* 2012; 18(4):368-74.
855. Wang SS, Hsieh MJ, Ou YC, Chen CS, Li JR, Hsiao PC, et al. Impacts of ICAM-1 gene polymorphisms on urothelial cell carcinoma susceptibility and clinicopathologic characteristics in Taiwan. *Tumour Biol* 2014; 35(8):7483-90.
856. Lin CW, Chuang CY, Tang CH, Chang JL, Lee LM, Lee WJ, et al. Combined effects of ICAM-1 single nucleotide polymorphisms and environmental carcinogens on oral cancer susceptibility and clinicopathologic development. *PLoS One* 2013; 8(9):e72940.
857. Stetler-Stevenson WG, Yu AE. Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. *Semin Cancer Biol* 2001; 11(2): 143-52.
858. Malesmud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci* 2006; 11:1696-1701.
859. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92:827-39.
860. Surlin V, Ioana M, Pleşea IE. Genetic patterns of metalloproteinases and their tissular inhibitors - clinicopathologic and prognostic significance in colorectal cancer. *Rom J Morphol Embryol* 2011; 52 (1 Suppl):231-36.
861. Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, Meyers J, Gusella JF, Ozelius LJ, et al. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. *Cancer Res* 1998; 58(23):5321-25.

862. Elander N, Söderkvist P, Fransén K. Matrix metalloproteinase (MMP) -1, -2, -3 and -9 promoter polymorphisms in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2006; 26(1B):791-5.
863. Ghilardi G, Biondi ML, Mangoni J, Leviti S, DeMonti M, Guagnellini E, et al. Matrix metalloproteinase-1 promoter polymorphism 1G/2G is correlated with colorectal cancer invasiveness. *Clin Cancer Res* 2001; 7(8):2344-46.
864. Woo M, Park K, Nam J, Kim JC. Clinical implications of matrix metalloproteinase-1, -3, -7, -9, -12, and plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphisms in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22(7):1064-70.
865. Liu D, Duan W, Guo H, Xu X, Bai Y. Meta-analysis of associations between polymorphisms in the promoter regions of matrix metalloproteinases and the risk of colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2011; 26(9):1099-105.
866. Liu D, Guo H, Li Y, Xu X, Yang K, Bai Y. Association between polymorphisms in the promoter regions of matrix metalloproteinases (MMPs) and risk of cancer metastasis: a meta-analysis. *PLoS One* 2012; 7(2):e31251.
867. Peng B, Cao L, Wang W, Xian L, Jiang D, Zhao J, et al. Polymorphisms in the promoter regions of matrix metalloproteinases 1 and 3 and cancer risk: a meta-analysis of 50 case-control studies. *Mutagenesis* 2010; 25(1):41-8.
868. Han G, Wei Z, Lu Z, Cui H, Bai X, Ge H, et al. Association between matrix metalloproteinase 1 -1607 1G>2G polymorphism and cancer risk: a meta-analysis including 19706 subjects. *Int J Clin Exp Med* 2014; 7(9):2992-99.
869. Lu L, Sun Y, Li Y, Wan P. The polymorphism MMP1 -1607 (1G>2G) is associated with a significantly increased risk of cancers from a meta-analysis. *Tumour Biol* 2014 [Epub ahead of print].
870. Zinzindohoué F, Lecomte T, Ferraz JM, Houllier AM, Cugnenc PH, Berger A, et al. Prognostic significance of MMP-1 and MMP-3 functional promoter polymorphisms in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(2 Pt 1):594-99.
871. Hettiaratchi A, Hawkins NJ, McKenzie G, Ward RL, Hunt JE, Wakefield D, et al. The collagenase-1 (MMP-1) gene promoter polymorphism - 1607/2G is associated with favourable prognosis in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 2007; 96(5):783-92.
872. Sternlicht MD, Lochter A, Simpson CJ, Huey B, Rougier JP, Gray JW, et al. The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell* 1999; 98(2):137-46.
873. Langers AM, Sier CF, Hawinkels LJ, Kubben FJ, van Duijn W, van der Reijden JJ, et al. MMP-2 geno-phenotype is prognostic for colorectal cancer survival, whereas MMP-9 is not. *Br J Cancer* 2008; 98(11):1820-23.
874. Harendza S, Lovett DH, Panzer U, Lukacs Z, Kuhn P, Stahl RA. Linked common polymorphisms in the gelatinase a promoter are associated with diminished transcriptional response to estrogen and genetic fitness. *J Biol Chem* 2003; 278(23):20490-99.
875. Peng B, Cao L, Ma X, Wang W, Wang D, Yu L. Meta-analysis of association between matrix metalloproteinases 2, 7 and 9 promoter polymorphisms and cancer risk. *Mutagenesis* 2010; 25(4):371-79.
876. Ting WC, Chen LM, Pao JB, Yang YP, You BJ, Chang TY, et al. Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases and clinical outcomes in colorectal cancer patients. *Int J Med Sci* 2013; 10(8):1022-27.
877. Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, de Maat M, Evans A, et al. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1999; 99(14):1788-94.
878. Fang WL, Liang WB, He H, Zhu Y, Li SL, Gao LB, et al. Association of matrix metalloproteinases 1, 7, and 9 gene polymorphisms with genetic susceptibility to colorectal carcinoma in a Han Chinese population. *DNA Cell Biol* 2010; 29(11):657-61.
879. Bustin SA, Jenkins PJ. The growth hormone-insulin-like growth factor-I axis and colorectal cancer. *Trends Mol Med* 2001; 7(10):4.
880. Silha JV, Murphy LJ. Insulin-like growth factor binding proteins in development. *Adv Exp Med Biol* 2005; 567:55-89.
881. Chhabra Y, Waters MJ, Brooks AJ. Role of the growth hormone-IGF-1 axis in cancer. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2010; 6:71-84.
882. Kuemmerle JF. Insulin-like growth factors in the gastrointestinal tract and liver. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2012; 41(2):409-23.
883. Samani AA, Yakar S, LeRoith D, Brodt P. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocr Rev* 2007; 28(1):20-47.
884. Feik E, Baierl A, Hieger B, Führlinger G, Pentz A, Stättner S, et al. Association of IGF1 and IGFBP3 polymorphisms with colorectal polyps and colorectal cancer risk. *Cancer Causes Control* 2010; 21(1):91-7.
885. Pechlivanis S, Wagner K, Chang-Claude J, Hoffmeister M, Brenner H, Försti A. Polymorphisms in the insulin like growth factor 1 and IGF binding protein 3 genes and risk of colorectal cancer. *Cancer Detect Prev* 2007; 31(5):408-16.
886. Keku TO, Vidal A, Oliver S, Hoyo C, Hall IJ, Omofoye O, et al. Genetic variants in IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, and adiponectin genes and colon cancer risk in African Americans and Whites. *Cancer Causes Control* 2012; 23(7):1127-38.
887. Karimi K, Mahmoudi T, Karimi N, Dolatmoradi H, Arkani M, Farahani H, et al. Is there an association between variants in candidate insulin pathway genes IGF-I, IGFBP-3, INSR, and IRS2 and risk of colorectal cancer in the Iranian population? *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14(9):5011-16.

888. Wong HL, Delellis K, Probst-Hensch N, Koh WP, Van Den Berg D, Lee HP, et al. A new single nucleotide polymorphism in the insulin-like growth factor I regulatory region associates with colorectal cancer risk in singapore chinese. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(1):144-51.
889. Morimoto LM, Newcomb PA, White E, Bigler J, Potter JD. Insulin-like growth factor polymorphisms and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(5):1204-11.
890. Xiang H, Liu L, Chu GD, Wei S, Liu JP, Xu YH, et al. Association between two functional polymorphisms of insulin-like growth factor binding protein 3 and colorectal cancer risk in a Chinese population. *J Toxicol Environ Health A* 2009; 72(11-12):706-11.
891. Quan H, Tang H, Fang L, Bi J, Liu Y, Li H. IGF1(CA)19 and IGFBP-3-202A/C gene polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. *Cell Biochem Biophys* 2014; 69(1):169-78.
892. Slattery ML, Samowitz W, Curtin K, Ma KN, Hoffman M, Caan B, et al. Associations among IRS1, IRS2, IGF1, and IGFBP3 genetic polymorphisms and colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13 (7):1206-14.
893. Ong J, Salomon J, te Morsche RH, Roelofs HM, Witteman BJ, Dura P, et al. Polymorphisms in the insulin-like growth factor axis are associated with gastrointestinal cancer. *PLoS One* 2014; 9(3):e90916.
894. Stanilov NS, Karakolev IA, Deliyev TS, Jovchev JP, Stanilova SA. Association of insulin-like growth factor-I receptor polymorphism with colorectal cancer development. *Mol Biol Rep* 2014; 41(12):8099-106.
895. Hoyo C, Murphy SK, Schildkraut JM, Vidal AC, Skaar D, Millikan RC, et al. IGF2R genetic variants, circulating IGF2 concentrations and colon cancer risk in African Americans and Whites. *Dis Markers* 2012; 32(2):133-41.
896. Xiang H, Wang Y, Nie S. Meta-analysis of the association between insulin-like growth factor binding protein 3 genetic polymorphisms and colorectal cancer susceptibility. *PLoS One* 2013; 8(3):e59665.
897. Le Marchand L, Kolonel LN, Henderson BE, Wilkens LR. Association of an exon 1 polymorphism in the IGFBP3 gene with circulating IGFBP-3 levels and colorectal cancer risk: the multiethnic cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 May; 14(5):1319-21.
898. Winder T, Zhang W, Yang D, Ning Y, Bohanes P, Gerger A, et al. Germline polymorphisms in genes involved in the IGF1 pathway predict efficacy of cetuximab in wild-type KRAS mCRC patients. *Clin Cancer Res* 2010; 16(22):5591-602.
899. Reed SI. The role of p34 kinases in the G1 to S-phase transition. *Annu Rev Cell Biol* 1992; 8:529-61.
900. Kim DH, Park SE, Kim M, Ji YI, Kang MY, Jung EH, et al. A functional single nucleotide polymorphism at the promoter region of cyclin A2 is associated with increased risk of colon, liver, and lung cancers. *Cancer* 2011; 117(17):4080-91.
901. Diehl JA. Cycling to cancer with cyclin D1. *Cancer Biol Ther* 2002; 1(3):226-31.
902. Betticher DC, Thatcher N, Altermatt HJ, Hoban P, Ryder WD, Heighway J. Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript. *Oncogene* 1995; 11(5):1005-11.
903. Le Marchand L, Seifried L, Lum-Jones A, Donlon A, Wilkens T. Association of the cyclin D1 L.R.A870G polymorphism with advanced colorectal cancer. *JAMA* 2003; 290(21):2843-48.
904. Porter F, Richards TR, Houlston FM, Evans RS, Jankowski DG, Macdonald JA. Contribution of *cyclin d1* (*CCND1*) and E-cadherin (*CDH1*) polymorphisms to familial and sporadic colorectal cancer. *Oncogene* 2002; 21(12):1928-33.
905. Garcia-Aguilar J, Chen Z, Smith DD, Li W, Madoff RD, Cataldo P, et al. Identification of a biomarker profile associated with resistance to neoadjuvant chemoradiation therapy in rectal cancer. *Hum Mutat* 2009; 30(4):661-68.
906. Yang J, Zhang G, Chen J. CCND1 G870A polymorphism is associated with increased risk of colorectal cancer, especially for sporadic colorectal cancer and in Caucasians: a meta-analysis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012; 36(2):169-77.
907. Chen B, Cao L, Yang P, Zhou Y, Wu XT. Cyclin D1 (CCND1) G870A gene polymorphism is an ethnicity-dependent risk factor for digestive tract cancers: a meta-analysis comprising 20,271 subjects. *Cancer Epidemiol* 2012; 36(2):106-15.
908. Zhang LQ, Wang J, Shang JQ, Bai JL, Liu FY, Guan X, et al. Cyclin D1 G870A polymorphism and colorectal cancer susceptibility: a meta-analysis of 20 populations. *Int J Colorectal Dis* 2011; 26(10):1249-55.
909. Yang Y, Wang F, Shi C, Zou Y, Qin H, Ma Y. Cyclin D1 G870A polymorphism contributes to colorectal cancer susceptibility: evidence from a systematic review of 22 case-control studies. *PLoS One* 2012; 7(5):e36813.
910. Tan XL, Nieters A, Kropp S, Hoffmeister M, Brenner H, Chang-Claude J. The association of cyclin D1 G870A and E-cadherin C-160A polymorphisms with the risk of colorectal cancer in a case control study and meta-analysis. *Int J Cancer* 2008; 122(11):2573-80.
911. Absenger G, Benhaim L, Szkandera J, Zhang W, Yang D, Labonte MJ. The cyclin D1 (CCND1) rs9344 G>A polymorphism predicts clinical outcome in colon cancer patients treated with adjuvant 5-FU-based chemotherapy. *Pharmacogenomics J* 2014; 14(2):130-34.
912. Zhang W, Gordon M, Press OA, Rhodes K, Vallböhmer D, Yang DY, et al. Cyclin D1 and epidermal growth factor polymorphisms associated with survival in patients with advanced colorectal cancer treated with Cetuximab. *Pharmacogenet Genomics* 2006; 16 (7):475-83.
913. Lolli G, Johnson LN. CAK-cyclin-dependent activating kinase: a key kinase in cell cycle control and a target for drugs? *Cell Cycle* 2005; 4(4): 572-77.

914. Custodio A, Moreno-Rubio J, Aparicio J, Gallego-Plazas J, Yaya R, Maurel J, et al. Pharmacogenetic predictors of severe peripheral neuropathy in colon cancer patients treated with oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy: a GEMCAD group study. *Ann Oncol* 2014; 25(2):398-403.
915. Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358(6381):15-16.
916. Marin MC, Jost CA, Brooks LA, Irwin MS, O'Nions J, Tidy JA, et al. A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nat Genet* 2000; 25(1):47-54.
917. Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC III, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 2003; 33(3):357-65.
918. Polakova V, Pardini B, Naccarati A, Landi S, Slysikova J, Novotny J, et al. Genotype and haplotype analysis of cell cycle genes in sporadic colorectal cancer in the Czech Republic. *Hum Mutat* 2009; 30(4):661-68.
919. Djansugurova L, Zhunussova G, Khussainova E, Iksan O, Afonin G, Kaidarova D, et al. Association of DCC, MLH1, GSTT1, GSTM1, and TP53 gene polymorphisms with colorectal cancer in Kazakhstan. *Tumour Biol* 2015; 36(1):279-89.
920. Song HR, Kweon SS, Kim HN, Piao JM, Yun WJ, Choi JS, et al. p53 codon 72 polymorphism in patients with gastric and colorectal cancer in a Korean population. *Gastric Cancer* 2011; 14(3):242-48.
921. Koushik A, Tranah GJ, Ma J, Stampfer MJ, Sesso HD, Fuchs CS, et al. p53 Arg72Pro polymorphism and risk of colorectal adenoma and cancer. *Int J Cancer* 2006; 119(8):1863-68.
922. Csejtei A, Tibold A, Varga Z, Koltai K, Ember A, Orsos Z, et al. GSTM, GSTT and p53 polymorphisms as modifiers of clinical outcome in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2008; 28(3B):1917-22.
923. Tan XL, Nieters A, Hoffmeister M, Beckmann L, Brenner H, Chang Claude J. Genetic polymorphisms in TP53, nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of colorectal cancer: evidence for gene environment interaction? *Pharmacogenet Genomics* 2007; 17(8):639-45.
924. Dahabreh IJ, Linardou H, Bouzika P, Varvarigou V, Murray S. TP53 Arg72Pro polymorphism and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19(7):1840-47.
925. Dahabreh IJ, Schmid CH, Lau J, Varvarigou V, Murray S, Trikalinos TA. Genotype misclassification in genetic association studies of the rs1042522 TP53 (Arg72Pro) polymorphism: a systematic review of studies of breast, lung, colorectal, ovarian, and endometrial cancer. *Am J Epidemiol* 2013; 177(12):1317-25.
926. Oeth P, del Mistro G, Marnellos G, Shi T, van den Boom D. Qualitative and quantitative genotyping using single base primer extension coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MassARRAY). *Methods Mol Biol* 2009; 578:307-43.
927. Meyer K, Ueland PM. Use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for multiplex genotyping. *Adv Clin Chem* 2011; 53:1-29.
928. Gabriel S, Ziaugra L, Tabbaa D. SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform. *Curr Protoc Hum Genet* 2009; Chapter 2: Unit 2.12.
929. Miller JK, Buchner N, Timms L, Tam S, Luo X, Brown AM, et al. Use of Sequenom sample ID Plus® SNP genotyping in identification of FFPE tumor samples. *PLoS One* 2014; 9(2):e88163.
930. Church D, Kerr R, Domingo E, Rosmarin D, Palles C, Maskell K, et al. "Toxgnostics": an unmet need in cancer medicine. *Nat Rev Cancer* 2014; 14(6):440-45.
931. Klopffleisch R, Weiss AT, Gruber AD. Excavation of a buried treasure-DNA, mRNA, miRNA and protein analysis in formalin fixed, paraffin embedded tissues. *Histol Histopathol* 2011; 26(6):797-810.
932. Sargent DJ, Patiyil S, Yothers G, Haller DG, Gray R, Benedetti J, et al. End points for colon cancer adjuvant trials: observation and recommendations based on individual patient data from 20,898 enrolled onto 18 randomized trials from the ACCENT Group. *J Clin Oncol* 2007; 25(29): 4569-74.
933. De Gramont A, Hubbard J, Shi Q, O'Connell MJ, Buyse M, Benedetti J, et al. Association between disease-free survival and overall survival when survival is prolonged after recurrence in patients receiving cytotoxic adjuvant therapy for colon cancer: simulations based on the 20,800 patient ACCENT Data Set. *J Clin Oncol* 2010; 28(3):460-65.
934. Sargent D, Shi Q, Yothers G, Van Cutsem E, Cassidy J, Saltz L, et al. Two or three year disease-free survival (DFS) as a primary end-point in stage III adjuvant colon cancer trials with fluoropyrimidines with or without oxaliplatin or irinotecan: data from 12676 patients from the MOSAIC, X-ACT, PETACC-3, C-06, C-07 and C89803. *Eur J Cancer* 2011; 47(7):990-96.
935. Ritchie MD. The success of pharmacogenomics in moving genetic association studies from bench to bedside: study design and implementation of precision medicine in the post-GWAS era. *Hum Genet* 2012; 131(10):1615-26.
936. Ni X, Zhang W, Huang RS. Pharmacogenomics discovery and implementation in GWAS era. *Wiley Interdiscipl Rev Syst Biol Med* 2013; 5(1):1-9.
937. McLeod HL. Cancer Pharmacogenomics: early promise, but concerted effort needed. *Science* 2013; 339(6127):1563-1566.
938. Guchelaar H-J, Gelderblom H, Van der Straaten T, Schellens JHM, Swen JJ. Pharmacogenetic in the cancer clinic: from candidate gene studies to next-generation sequencing. *Clin Pharmacol Ther* 2014;95(4):383-85.
939. Begum F, Ghosh D, Tseng GC, Feingold E. Comprehensive literature review and statistical considerations for GWAS meta-analysis. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(9):3777-84.

940. Wang K, Li M, Hakonarson H. Analysing biological pathways in genome-wide association studies. *Nat Rev Genet* 2010; 11(12):843-54.
941. Huang RS, Ratain MJ. Pharmacogenetics and pharmacogenomics of anticancer agents. *CA Cancer J Clin* 2009; 59(1):42-55.
942. Fernandez-Rozadilla C, Cazier JB, Moreno V, Crous-Bou M, Guinó E, Durán G, et al. Pharmacogenomics in colorectal cancer: a genome-wide association study to predict toxicity after 5-fluorouracil or FOLFOX administration. *Pharmacogenomics J* 2013; 13(3):209-17.
943. Pearson TA, Manolio TA. How to interpret a genome-wide association study. *JAMA* 2008; 299(11): 1335-44.
944. Cantor RM, Lange K, Sinsheimer JS. Prioritizing GWAS results: A review of statistical methods and recommendations for their application. *Am J Hum Genet* 2010; 86(1):6-22.
945. Manolio TA. Genomewide associations studies and assessment of the risk of disease. *N Engl J Med* 2010; 363(2):166-76.
946. Faye LL, Sun L, Dimitromanolakis A, Bull SB. A flexible genome-wide bootstrap method that accounts for ranking and threshold-selection bias in GWAS interpretation and replication study design. *Stat Med* 2011; 30(15):1898-1912.
947. Gibson G. Rare and common variants: twenty arguments. *Nat Rev Genet* 2012; 13 (2):135-45.
948. Zhang B, Jia WH, Matsuda K, Kweon SS, Matsuo K, Xiang YB, et al. Large-scale genetic study in East Asians identifies six new loci associated with colorectal cancer risk. *Nat Genet* 2014; 46(6):533-42.
949. Zhang B, Jia WH, Matsuo K, Shin A, Xiang YB, Matsuda K, et al. Genome-wide association study identifies a new SMAD7 risk variant associated with colorectal cancer risk in East Asians. *Int J Cancer* 2014; 135(4):948-55.
950. Fortini BK, Tring S, Plummer SJ, Edlund CK, Moreno V, Bresalier RS, et al. Multiple functional risk variants in a SMAD7 enhancer implicate a colorectal cancer risk haplotype. *PLoS One* 2014; 9(11):e111914.
951. Peters U, Hutter CM, Hsu L, Schumacher FR, Conti DV, Carlson CS, et al. Meta-analysis of new genome-wide association studies of colorectal cancer risk. *Hum Genet* 2012; 131(2):217-34.
952. Peters U, Jiao S, Schumacher FR, Hutter CM, Aragaki AK, Baron JA, et al. Identification of genetic susceptibility loci for colorectal tumors in a genome-wide meta-analysis. *Gastroenterology* 2013; 144(4):799-807.
953. Whiffin N, Hosking FJ, Farrington SM, Palles C, Dobbins SE, Zgaga L, et al. Identification of susceptibility loci for colorectal cancer in a genome-wide meta-analysis. *Hum Mol Gene* 2014; 23(17):4729-37.
954. Wang K. Testing for genetic association in the presence of population stratification in genome-wide association studies. *Genet Epidemiol* 2009; 33(7):637-45.
955. Sun L, Dimitromanolakis A, Faye LL, Paterson AD, Waggott D; DCCT/EDIC Research Group, Bull SB. BR-squared: a practical solution to the winner's curse in genome-wide scans. *Hum Genet* 2011; 129(5):545-52.
956. International HapMap 3 Consortium. Altshuler DM, Gibbs RA, Dermitzakis E, Schaffner SF, YU F, et al. Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature* 2010; 467 (7311):52-58.
957. Wheeler HE, Dolan ME. Lymphoblastoid cell lines in pharmacogenomics discovery and clinical translation. *Pharmacogenomics* 2012; 13(1):55-70.
958. Argyriou AA, Velasco R, Briani C, Cavaletti G, Bruna J, Alberti P, et al. Peripheral neurotoxicity of oxaliplatin in combination with 5-fluorouracil (FOLFOX) or capecitabine (XELOX): a prospective evaluation of 150 colorectal cancer patients. *Ann Oncol* 2012; 23(12):3116-22.
959. Baek KK, Lee J, Park SH, Park JO, Park YS, Lim HY, et al. Oxaliplatin-induced chronic peripheral neurotoxicity: a prospective analysis in patients with colorectal cancer. *Cancer Res Treat* 2010; 42(4):185-90.
960. Binia A, Contreras AV, Canizales-Quinteros S, Alonzo VA, Tejero ME, Silva-Zolezzi I. Geographical and ethnic distribution of single nucleotide polymorphisms within genes of the folate/homocysteine pathway metabolism. *Genes Nutr* 2014; 9(5):421.
961. Sai K, Saito Y. Ethnic differences in the metabolism, toxicology and efficacy of three anticancer drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2011; 7(8):967-88.
962. Krause T, Turner GA. Are selectins involved in metastasis? *Clin Exp Metastasis* 1999; 17(3):183-92.
963. Alessandro R, Seidita G, Flugy AM, Damiani F, Russo A, Corrado C, et al. Role of S128R polymorphism of E-selectin in colon metastasis formation. *Int J Cancer* 2007; 121(3): 528-35.
964. Porquet N, Poirier A, Houle F, Pin AL, Gout S, Tremblay PL, et al. Survival advantages conferred to colon cancer cells by E-selectin-induced activation of the PI3K-NFκB survival axis downstream of Death receptor-3. *BMC Cancer* 2011;11,285.
965. St Hill CA. Interactions between endothelial selectins and cancer cells regulate metastasis. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2011; 16:3233-51.
966. Köhler S, Ullrich S, Ritcher U, Schumacher U. E-/P-selectins and colon carcinoma metastasis: first in vivo evidence for their crucial role in a clinically relevant model of spontaneous metastasis formation in the lung. *Br J Cancer* 2010; 102(3):602-09.
967. St Hill CA, Baharo-Hassan D, Farooqui M. C2-O-sLeX glycoproteins are E-selectin ligands that regulate invasion of human colon and hepatic carcinoma cells. *PLoS One* 2011; 6(1):e16281.
968. Kumar P, Amin MA, Harlow LA, Polverini PJ, Koch AE. Src and phosphatidylinositol 3-kinase mediate soluble E-selectin-induced angiogenesis. *Blood* 2003; 101(10):3960-68.

969. Alessandro R, Flugy AM, Russo D, Stassi G, De Leo A, Corrado C, et al. Identification and phenotypic characterization of a subpopulation of T84 human colon cancer cells, after selection on activated endothelial cells. *J Cell Physiol* 2005; 203(1):261-72.
970. Di Bella MA, Flugy AM, Russo D, D'Amato M, De Leo G, Alessandro R. Different phenotypes of colon carcinoma cells interacting with endothelial cells: role of E-selectin and ultrastructural data. *Cell Tissue Res* 2003; 312(1):55-64.
971. Sawada R, Tsuboi S, Fukuda M. Differential E-selectin-dependent adhesion efficiency in sublines of a human colon cancer exhibiting distinct metastatic potentials. *J Biol Chem*. 1994 Jan 14; 269(2):1425-31.
972. Al-Mehdi AB, Tozawa K, Fisher AB, Shientag L, Lee A, Muschel RJ. Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat Med* 2000; 6(1):100-02.
973. Wenzel K, Felix S, Kleber FX, Brachold R, Menke T, Schattke S, et al. E-selectin polymorphism and atherosclerosis: an association study. *Hum Mol Genet* 1994; 3(11):1935-37.
974. Wang X, Zhang J, Du X, Song M, Jia C, Liu H. Association of A561C and G98T polymorphisms in E-selectin gene with coronary artery disease: a meta-analysis. *PLoS One* 2013; 8(11):e79301.
975. Zhao DX, Feng J, Cong SY, Zhang W. Association of E-selectin gene polymorphisms with ischemic stroke in a Chinese Han population. *J Neurosci Res* 2012; 90(9): 1782-87.
976. El-Magadmi M, Alansari A, Teh LS, Ordi J, Gül A, Inanc M, et al. Association of the A561C E-selectin polymorphism with systemic lupus erythematosus in 2 independent populations. *J Rheumatol* 2001; 28(12):2650-52.
977. Kanmaz-Özer M, Dogru-Abbasoglu S, Vural P, Ozderya A, Karadag B, Uysal M. ICAM1 K469E and E-selectin S128R polymorphisms could predispose to increased autoantibody production and TSH suppression in Graves' disease. *Mol Biol Re* 2013; 40(3):2717-22.
978. Cooper DN. Functional intronic polymorphisms: Buried treasure awaiting discovery within our genes. *Hum Genomics* 2010; 4(5):284-88.
979. Sarter B, Long TI, Tsong WH, Koh WP, Yu MC, Laird PW, et al. Sex differential in methylation patterns of selected genes in Singapore Chinese. *Hum Genet* 2005; 117(4):402-3.
980. Sohn KJ, Jang H, Campan M, Weisenberger DJ, Dickhout J, Wang YC, et al. The methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation induces cell-specific changes in genomic DNA methylation and uracil misincorporation: a possible molecular basis for the site-specific cancer risk modification. *Int J Cancer* 2009; 124(9):1999-2005.
981. Kawakami K, Omura K, Kanehira E, Watanabe G. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism is associated with folate pool in gastrointestinal cancer tissue. *Anticancer Res* 2001; 21(1A):285-89.
982. Kawakami K, Ruszkiewicz A, Bennett G, Moore J, Watanabe G, Iacopetta B. The folate pool in colorectal cancers is associated with DNA hypermethylation and with a polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase. *Clin Cancer Res* 2003; 9(16 Pt 1):5860-65.
983. Torre ML, Russo GT, Ragonese M, Giandalia A, De Menis E, Arnaldi G, et al. MTHFR C677T polymorphism, folate status and colon cancer risk in acromegalic patients. *Pituitary* 2014; 17(3):257-66.
984. Guerreiro CS, Carmona B, Gonçalves S, Carolino E, Fidalgo P, Brito M, et al. Risk of colorectal cancer associated with the C677T polymorphism in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase in Portuguese patients depends on the intake of methyl-donor nutrients. *Am J Clin Nutr* 2008; 88(5):1413-18.
985. Deans B, Griffin CS, O'Regan P, Jasim M, Thacker J. Homologous recombination deficiency leads to profound genetic instability in cells derived from Xrcc2-knockout mice. *Cancer Res* 2003; 63(23):8181-87.
986. Roos WP, Nikolova T, Quiros S, Naumann SC, Kiedron O, Zdzenicka MZ, Kaina B. Brca2/Xrcc2 dependent HR, but not NHEJ, is required for protection against O-6-methylguanine triggered apoptosis, DSBs and chromosomal aberrations by a process leading to SCEs. *DNA Repair* 2009; 8(1):72-86.
987. Sprong D, Janssen HDL, Vens C, Begg AC. Resistance of hypoxic cells to ionizing radiation is influenced by homologous recombination status. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 64(2):562-72.
988. Gordon MA, Zhang W, Yang D, Iqbal S, El-Khouiery A, Nagashima F, et al. Gender-specific genomic profiling in metastatic colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil and oxaliplatin. *Pharmacogenomics* 2011; 12(1): 27-39.
989. Bohanes P, Yang D, Loupakis F, LaBonte MJ, Gerger A, Ning Y, et al. Integrin genetic variants and stage-specific tumor recurrence in patients with stage II and III colon cancer. *Pharmacogenomics J* 2014 [Epub ahead of print].
990. Ferlitsch M, Reinhart K, Pramhas S, Wiener C, Gal O, Bannert C, et al. Sex-specific prevalence of adenomas, advanced adenomas, and colorectal cancer in individuals undergoing screening colonoscopy. *JAMA* 2011; 306(12): 1352-58.
991. Nguyen SP, Bent S, Chen YH, Terdiman JP. Gender as a risk factor for advanced neoplasia and colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; 7(6):676-81.
992. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002; 288(3): 321-33.
993. Cho YK, Kim HC, Kim SH, Park JH, Yun HR, Cho YB, et al. Location-related differences in sporadic microsatellite unstable colorectal cancer. *Dig Liver Dis* 2010; 42(9):611-15.
994. Pellegrini P, Contasta I, Del Beato T, Ciccone F, Berghella AM. Gender-specific cytokine pathways, targets, and biomarkers for the switch from health to adenoma and colorectal cancer. *Clin Dev Immunol* 2011; 2011: 819724.

995. Mariani M, Zannoni GF, Sioletic S, Sieber S, Martino C, Martinelli E, et al. Gender influences the class III and V β -tubulin ability to predict poor outcome in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2012; 18(10):2964-2975.
996. Curtin K, Bigler J, Slaterry ML, Caan B, Potter JD, Ulrich CM. MTHFR C677T and A1298C polymorphisms: diet, estrogen, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13(2):285-92.
997. Mijatovic V, van der Mooren MJ. Homocysteine in postmenopausal women and the importance of hormone replacement therapy. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39(8):764-67.
998. Castro R, Rivera I, Ravasco P, Jakobs C, Blom HJ, Camilo ME, et al. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T and 1298A>C mutations are genetic determinants of elevated homocysteine. *QJM* 2003; 96(4):297-303.
999. Sarter B, Long TI, Tsong WH, Koh WP, Yu MC, Laird PW. Sex differential in methylation patterns of selected in Singapore Chinese. *Hum Genet* 2005; 117(4):402-3.
1000. Läubli H, Borsig L. Selectins promote tumor metastasis. *Semin Cancer Biol* 2010; 20(3):167-77.
1001. Marathe DD, Buffone Jr A, Chandrasekaran EV, Xue J, Locke RD, Nasirikenari M, et al. Fluorinated per-acetylated GalNAc metabolically alters glycan structures on leukocyte PSGL-1 and reduces cell binding to selectins. *Blood* 2010; 115(6):1303-12.
1002. Brown JR, Yang F, Sinha A, Ramakrishnan B, Tor Y, Qasba PK, et al. Deoxygenated disaccharide analogs as specific inhibitors of β 1-4-galactosyltransferase 1 and selectin-mediated tumor metastasis. *J Biol Chem* 2009; 284(8):4952-59.
1003. Kutlar A, Ataga KI, McMahon L, Howard J, Galacteros F, Hagar W, et al. A potent oral P-selectin blocking agent improves microcirculatory blood flow and a marker of endothelial cell injury in patients with sickle cell disease. *Am J Hematol* 2012; 87(5):536-39.
1004. Kneuer C, Ehrhardt C, Radomski MW, Bakowsky U. Selectins-potential pharmacological targets? *Drug Discov Today* 2006; 11 (21-22):1034-40.
1005. Eppihimer MJ, Schaub RG. Soluble P-selectin antagonist mediates rolling velocity and adhesion of leukocytes in acutely inflamed venules. *Microcirculation* 2001; 8(1):15-24.
1006. Borsig L. Antimetastatic activities of heparins and modified heparins. Experimental evidence. *Thromb Res* 2010; 125 (Suppl 2):S66-71.
1007. Gomes AM, Kozlowski EO, Borsig L, Teixeira FC, Vlodavsky I, Pavão MS. Antitumor properties of a new non-anticoagulant heparin analog from the mollusk *Nodipecten nodosus*: Effect on P-selectin, heparanase, metastasis and cellular recruitment. *Glycobiology* 2014 [Epub ahead of print].
1008. Kuderer NM, Ortel TL, Francis CW. Impact of venous thromboembolism and anticoagulation on cancer and cancer survival. *J Clin Oncol* 2009; 27(29):4902-11.
1009. Park JC, Pratz CF, Tesfaye A, Brodsky RA, Antonarakis ES. The effect of therapeutic anticoagulation on overall survival in men receiving first-line docetaxel chemotherapy for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer* 2015; 13(1):32-8.
1010. Läubli H, Borsig L. Heparins attenuate cancer metastasis: are selectins the link? *Cancer Invest* 2009; 27(5):474-81.
1011. Auer R, Scheer A, Wells PS, Boushey R, Asmis T, Jonker D, et al. The use of extended perioperative low molecular weight heparin (tinzaparin) to improve disease-free survival following surgical resection of colon cancer: a pilot randomized controlled trial. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2011; 22(8):760-62.
1012. Cuvuto P, Fenech MF. A review of methionine dependency and the role of methionine restriction in cancer growth control and life-span extension. *Cancer Treat Rev* 2012; 38(6):726-36.
1013. Stankova J, Shang J, Rozen R. Antisense inhibition of methylenetetrahydrofolate reductase reduces cancer cell survival in vitro and tumor growth in vivo. *Clin Cancer Res* 2005; 11(5):2047-52.
1014. Stankova J, Lawrence AK, Rozen R. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): a novel target for cancer therapy. *Curr Pharm Des* 2008; 14(11):1143-50.